

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

Школа Инженерная школа новых производственных технологий
Направление подготовки 19.04.01 Биотехнология
Отделение школы (НОЦ) НОЦ Н.М. Кижнера

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Получение пептида UBI₁₈₋₃₅ для диагностики септического воспаления

УДК 577.112.6-048.23:616.94

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ61	Киржаева Любовь Сергеевна		04.06.2018

Руководитель ВКР

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ИШХБМТ	Першина А.Г.	к.б.н., доцент		04.06.2018

КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент Отделения социально- гуманитарных наук ШБИП	Креницына З.В.	к.т.н., доцент		14.05.2018

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор Отделения контроля и диагностики ИШНКБ	Ахмеджанов Р.Р.	д.б.н., профессор		05.05.18

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор НОЦ Н.М. Кижнера	Потапов А.С.	д.х.н., профессор		4.06.18

Томск – 2018 г.

Планируемые результаты обучения
по ООП 19.04.01 «Биотехнология» (магистр)
профиль «Биотехнология»

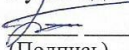
Код результата	Результат обучения (выпускник должен быть готов)
<i>Профессиональные компетенции</i>	
P1	Профессионально эксплуатировать современные биотехнологические производства, обеспечивая их высокую эффективность и безопасность
P2	Разрабатывать и внедрять новые биотехнологические процессы и оборудование в рамках проектирования новых и усовершенствования действующих производств
P3	Проводить теоретические и экспериментальные исследования в различных областях прикладной биотехнологии
<i>Универсальные компетенции</i>	
P4	Ставить и решать задачи инженерного анализа для создания инновационных биотехнологических процессов и продуктов
P5	Эффективно организовывать и участвовать в работе коллективов, в том числе международных, демонстрировать ответственность за результаты инженерной деятельности
P6	Демонстрировать глубокие знания социальных, этических и правовых аспектов инновационной инженерной деятельности, компетентность в вопросах устойчивого развития
P7	Постоянно повышать интеллектуальный и общекультурный уровень и профессиональную квалификацию, способствовать обучению персонала

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

Школа Инженерная школа новых производственных технологий
Направление подготовки (специальность) Биотехнология
Отделение школы (НОЦ) НОЦ Н.М. Кижнера

УТВЕРЖДАЮ:

Руководитель ООП

 12.03.18 Морозов А.С.
(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
4ДМ61	Киржаевой Любове Сергеевне

Тема работы:

Получение пептида UBI₁₈₋₃₅ для диагностики септического воспаления

Утверждена приказом директора (дата, номер)

Приказ №1531/с 06.03.2018

Срок сдачи студентом выполненной работы:

02.06.2018

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:

Объектом исследования являются рекомбинантная технология получения антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅


Литературные данные:

Статьи и книги по рекомбинантным технологиям получения белков и пептидов, их очистке и анализу


<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; Осуществление комплекса биохимических и молекулярно-биологических методик для выполнения исследования; Анализ результатов проведённой работы; Анализ экономической эффективности и ресурсоэффективности разрабатываемой технологии; Анализ вредных и опасных факторов при проведении исследований, составление перечня для их регулирования; Формулировка выводов и заключений по работе</p>
<p>Перечень графического материала</p> <p><i>(с точным указанием обязательных чертежей)</i></p>	<p>31 таблица, 12 рисунков</p>
<p>Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы</p> <p><i>(с указанием разделов)</i></p>	
<p>Раздел</p>	<p>Консультант</p>
<p>Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение</p>	<p>Креницына Зоя Васильевна</p>
<p>Социальная ответственность</p>	<p>Ахмеджанов Рафик Равильевич</p>
<p>Часть ВКР на английском языке</p>	<p>Кобзева Надежда Александровна</p>
<p>Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:</p>	
<p>Раздел 1. Обзор литературы</p>	

<p>Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику</p>	<p>29.01.2018</p>
--	-------------------

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ИШХБМТ	Першина А.Г.	к.б.н., доцент		12.03.2018

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ61	Киржаева Любовь Сергеевна		12.03.2018

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

Студенту:

Группа	ФИО
4ДМ61	Киржаевой Любове Сергеевне

Школа	инженерная школа новых производственных технологий	Отделение школы (НОЦ)	НОЦ им.Н.М.Кижнера
Уровень образования	магистр	Направление/специальность	19.04.01 Биотехнология

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

1. Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих	Оценить стоимости материально-технических ресурсов для разработки метода получения рекомбинантного антимикробного пептида UBI ₁₈₋₃₅ для диагностики септического воспаления
2. Нормы и нормативы расходования ресурсов	В соответствии с ГОСТ 14.322-83 «Нормирование расхода материалов» и ГОСТ Р 51541-99 «Энергосбережение. Энергетическая эффективность»

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ	Оценить коммерческий и инновационный потенциал технологии получения рекомбинантного антимикробного пептида для его последующего применения в области радиофармацевтики
2. Разработка устава научно-технического проекта	2.1. Устав проекта 2.2. Организационная структура проекта 2.3 Ограничения и допущения проекта
3. Планирование процесса управления НТИ: структура и график проведения, бюджет, риски и организация закупок	3.1 Формирование бюджета научного исследования 3.2 Организационная структура проекта 3.3 Матрица ответственности 3.4 Оценка рисков проекта
4. Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности	4.1 Оценка сравнительной эффективности исследования

Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):

1. Сегментирование рынка
2. Диаграмма Исикавы
3. Организационная структура проекта
4. Иерархическая структура рисков
5. Диаграмма Ганта

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	18.03.2018
--	------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент, отделения социально-гуманитарных наук ШБМП	Креницына Зоя Васильевна	к.т.н.		18.03.2018

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ61	Киржаева Любовь Сергеевна		18.03.2018

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

Группа	ФИО
4ДМ61	Киржаевой Любови Сергеевне

Школа	Инженерная школа новых производственных технологий	Отделение школы (НОЦ)	НОЦ им.Н.М.Кижнера
Уровень образования	магистр	Направление/специальность	19.04.01 Биотехнология

Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:

<p>1. Описание рабочего места (рабочей зоны, технологического процесса, механического оборудования) на предмет возникновения:</p> <ul style="list-style-type: none"> – вредных проявлений факторов производственной среды (метеоусловия, вредные вещества, освещение, шумы, вибрации, электромагнитные поля, ионизирующие излучения) – опасных проявлений факторов производственной среды (механической природы, термического характера, электрической, пожарной и взрывной природы) – негативного воздействия на окружающую природную среду (атмосферу, гидросферу, литосферу) – чрезвычайных ситуаций (техногенного, стихийного, экологического и социального характера) 	<p>Объектом исследования является методика получения рекомбинантного антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅ для диагностики септического воспаления. Рабочая зона - центральная научно-исследовательская лаборатория СибГМУ в которой осуществляется исследование, представлена восемью отдельными вентилируемыми кабинетами с возможностью их обеззараживания при помощи ультрафиолета.</p> <p>Область применения – клиническая медицина.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Недостаточная освещенность: - действие фактора на организм человека: снижение зрительной функции, повышение уровня утомляемости; - приведение допустимых норм рабочей зоны с необходимой размерностью: КЕО при естественном освещении - 1,2 %, КЕО при совмещенном освещении - 2,1 %, освещенность при искусственном комбинированном освещении - 500 лк, при общем освещении - 400 лк. - лаборатория оборудована системами отопления, кондиционирования воздуха или эффективной приточно-вытяжной вентиляцией; - действие фактора на организм человека: системы вентиляции и отопления в лабораторном помещении обеспечивают параметры микроклимата в соответствии с требованиями; - приведение допустимых норм рабочей зоны с необходимой размерностью: температура воздуха в холодный период года - 19-24 °С, температура воздуха в теплый период года - 20-28 °С, относительная влажность воздуха - 15-75 %
<p>2. Перечень законодательных и нормативных документов по теме</p>	<p>(СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278–03. Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещенному освещению жилых и общественных зданий), (СанПиН 2.2.4.548–96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений);</p>
Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:	
<p>1. Анализ выявленных вредных факторов проектируемой производственной среды в следующей</p>	<p>Характеристика вредных факторов: 1. Биологические:</p>

последовательности:

- физико-химическая природа вредности, её связь с разрабатываемой темой;
- действие фактора на организм человека;
- приведение допустимых норм с необходимой размерностью (со ссылкой на соответствующий нормативно-технический документ);
- предлагаемые средства защиты (сначала коллективной защиты, затем – индивидуальные защитные средства)

- физико-химическая природа вредности, её связь с разрабатываемой темой: работа с условно-патогенными микроорганизмами: *E.coli* в соответствии с ГОСТ 12.1.008-76 «ССБТ. Биологическая безопасность. Общие требования»;
- действие фактора на организм человека: инфицирование человека;
- рекомендуемые средства защиты - система фильтрации, работа в ламинарном боксе при горячей спиртовке с использованием средств индивидуальной защиты;
- 2. Вредные вещества: кислоты (соляная кислота HCl , муравьиная кислота $HCOOH$, спирт C_2H_5OH)
- работа с токсичными, летучими и легковоспламеняющимися веществами 3 и 4 класса опасности;
- действие фактора на организм человека: раздражение дыхательных путей и слизистой, угнетение ЦНС, раздражение кожных покровов;
- приведение допустимых норм для рабочей зоны с необходимой размерностью: этанол - 1000 мг/м³, изопропиловый спирт - 10 мг/м³, (ГОСТ 12.1.007–76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности);
- рекомендуемые средства защиты (система вентиляции, работа в вытяжном шкафу с использованием средств индивидуальной защиты);
- 3. Недостаточная освещенность:
- действие фактора на организм человека: снижение зрительной функции, повышение уровня утомляемости;
- приведение допустимых норм рабочей зоны с необходимой размерностью: КЕО при естественном освещении - 1,2 %, КЕО при совмещенном освещении - 2,1 %, освещенность при искусственном комбинированном освещении - 500 лк, при общем освещении - 400 лк (СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278–03. Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещенному освещению жилых и общественных зданий);
- рекомендуемые средства защиты (наличие остекленных оконных проемов, люминесцентных ламп дневного освещения; проведение очистки стекол оконных рам и светильников два раза в год и своевременная замена перегоревших ламп);
- 4. Микроклимат помещений:
- лаборатория оборудована системами

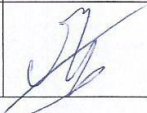
	<p>отопления, кондиционирования воздуха или эффективной приточно-вытяжной вентиляцией;</p> <p>- действие фактора на организм человека: системы вентиляции и отопления в лабораторном помещении обеспечивают параметры микроклимата в соответствии с требованиями;</p> <p>- приведение допустимых норм рабочей зоны с необходимой размерностью: температура воздуха в холодный период года - 19-24 °С, температура воздуха в теплый период года - 20-28 °С, относительная влажность воздуха - 15-75 % (СанПиН 2.2.4.548–96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений);</p> <p>- рекомендуемые средства защиты - установка, диагностика и ремонт системы вентиляции и отопления.</p>
<p>2. Анализ выявленных опасных факторов проектируемой производённой среды в следующей последовательности</p> <ul style="list-style-type: none"> – механические опасности (источники, средства защиты); – термические опасности (источники, средства защиты); – электробезопасность (в т.ч. статическое электричество, молниезащита – источники, средства защиты); – пожаровзрывобезопасность (причины, профилактические мероприятия, первичные средства пожаротушения) 	<p>Анализ опасных факторов при выполнении исследования:</p> <p>- термические опасности:</p> <p>- в лаборатории источниками термических ожогов являются: горелки, электрическая плитка, паровой автоклав, неосторожное обращение с кипящей жидкостью (питательная среда, вода).</p> <p>Меры защиты</p> <ul style="list-style-type: none"> - при нагревании жидкостей необходимо использовать дополнительные средства защиты: перчатки с термозащитой; - перед зажиганием спиртовки нужно удостовериться, что корпус ее исправен, фитиль выпущен на нужную высоту и распущен, а горловина и держатель фитиля сухие. (Инструкция по охране труда при работе в химической лаборатории ИОТ-003-10). - электроопасность, в т.ч. статическое электричество: <ul style="list-style-type: none"> – поражение человека электрическим током возможно лишь при замыкании электрической цепи. - пожаровзрывоопасность: <ul style="list-style-type: none"> - разлив легко воспламеняющейся жидкости изобутанол, ацетон <p>Меры защиты при использовании легко воспламеняющихся жидкостей:</p> <ul style="list-style-type: none"> - использовать отдаленно от нагревательных приборов и открытого огня. <p>В случае возникновения ЧС предусмотрены первичные средства пожаротушения: огнетушители ОУ и ОУ-5 для тушения электрооборудования.</p>

<p>3. Охрана окружающей среды:</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>Экологическая безопасность:</p> <ul style="list-style-type: none"> - анализ воздействия объекта на окружающую среду: <i>E.coli</i> являются естественными обитателями кишечника; - с целью охраны атмосферы все работы должны проводиться в вытяжном шкафу при включенной вентиляции и обеспечении герметичности тары для хранения и транспортировки вредных и опасных веществ; - для предотвращения загрязнения гидросферы химическими веществами проводится организации раздельного сбора и хранения неорганических и органических отходов, обезвреживание кислых и щелочных стоков согласно утвержденным инструкциям, регенерация растворителей; - твердые отходы в виде отработанного биоматериала подлежат обезвреживанию методом стерилизации, после чего они приравниваются пищевым отходам, и выбрасываются в мусорный контейнер. (Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08. Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней).
<p>4. Защита в чрезвычайных ситуациях:</p> <ul style="list-style-type: none"> - перечень возможных ЧС на объекте; - выбор наиболее типичной ЧС; - разработка превентивных мер по предупреждению ЧС; - разработка мер по повышению устойчивости объекта к данной ЧС; - разработка действий в результате возникшей ЧС и мер по ликвидации её последствий 	<p>К чрезвычайным ситуациям относится возникновение пожара на рабочем месте в результате разлива легко воспламеняющихся жидкостей, возгорание оборудования.</p> <p>Перечень наиболее вероятных ЧС:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Пожар; 2) Взрыв <p>Превентивные меры по предупреждению ЧС:</p> <ul style="list-style-type: none"> - инструктаж по технике безопасности; - своевременная поверка и калибровка оборудования; - текущее обслуживание оборудования; - контроль работы оборудования. <p>Разработка действий в результате возникшей ЧС и ликвидация ее последствий:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ликвидация ЧС с использованием первичных средств пожаротушения: огнетушитель ОП-5 для тушения электрооборудования и горючих жидкостей.

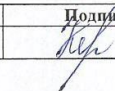
	<p>- организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны: Лаборатория должна быть расположена в помещениях с естественным освещением, отоплением, водопроводом и канализацией. Работать в лаборатории необходимо в халате, защитная одежда и кожу от попадания и разбрызгивания реактивами и обсемененности микроорганизмами. Все работы с чрезвычайно и высокоопасными веществами следует проводить только в вытяжных шкафах. Каждый должен работать на закрепленном за ним рабочем месте. Все рабочие места оборудуют предметами, необходимыми для повседневной работы. Рабочее место следует поддерживать в чистоте, не загромождать его посудой и побочными вещами.</p>
<p>Перечень графического материала:</p>	
<p>При необходимости представить эскизные графические материалы к расчётному заданию (обязательно для специалистов и магистров)</p>	

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор, отделения контроля и качества ИШНКБ	Ахмеджанов Рафик Равильевич	Д.б.н		14.03.18

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ61	Киржаева Любовь Сергеевна		14.03.2018

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 107 страниц, 12 рисунков, 31 таблица, 65 источников, 1 приложение

Ключевые слова: антимикробные пептиды, экспрессия в бактериальных клетках, гельфильтрация, UBI₁₈₋₃₅, хроматография биомолекул

Объектом исследования является: рекомбинантная технология получения антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅

Цель работы – разработать методику очистки рекомбинантного антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅

В процессе исследования проводились работы по оптимизации условий получения функционально активного рекомбинантного антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅

В результате исследования предложен метод очистки рекомбинантного антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅ с использованием гельфильтрационной хроматографии и подтверждена способность пептида связываться с микробными клетками *in vitro*

Область применения: диагностика септического воспаления

Экономическая эффективность/значимость работы: 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 данной работе применены следующие термины с соответствующими определениями:

Антимикробные пептиды: это гидрофобные, положительно заряженные молекулы, состоящие из 8-20 аминокислотных остатков.

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. Рекомбинантными ДНК в составе плазмид или вирусных векторов могут быть трансформированы клетки живых организмов.

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

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ПААГ — полиакриламидный гель

КТ- компьютерная томография

МРТ- магнитно – резонансная томография

ОФЭКТ- однофотонная эмиссионная компьютерная томография

РФП- радиофармпрепараты

УЗИ- ультразвуковое исследование

His-tag – участок белковой молекулы, представленный шестью остатками гистидина

KSI – кетостероидизомераза

UBI – убиквицидин

Оглавление

Введение.....	7
1 Обзор литературы	10
1.1 Диагностика гнойных инфекций.....	10
1.2 Антимикробные пептиды.....	13
1.3 Твердофазный синтез пептидов	17
2 Объект, методы и материалы исследования	28
2.1 Объект исследования	28
2.2 Материалы	28
2.2.2 Рабочие материалы	29
2.2.3 Расходные материалы.....	29
2.3 Методы.....	30
2.3.1 Приготовление сред.....	30
2.3.3 Электрофорез белков в полиакриламидном геле	31
2.3.4 Отмывка телец включения KSI-2xUBI ₁₈₋₃₅	32
2.3.5 Аффинная хроматография (очистка на Ni-NTA агарозе).....	32
2.3.6 Диализ	33
2.3.7 Химическое отщепление UBI ₁₈₋₃₅ от белка партнера с использованием CNBr.....	33
2.3.8 Электрофорез низкомолекулярных белков и пептидов.....	33
2.3.9 Гель – фильтрационная хроматография (Bio-Gel P 2)	34
2.3.10 Гель – фильтрационная хроматография (Sephadex G-10).....	34
2.3.11 Анализ функциональной активности рекомбинантного пептида.....	35
3 Результаты	37
3.1 Индукция экспрессии рекомбинантного антимикробного пептида UBI ₁₈₋₃₅ в составе белка-слияния с кетостероидизомеразой и 6-гистидиновым тагом в клетках <i>E.coli</i> Rosetta (DE3) pLysS/ pET31b-2xUBI ₁₈₋₃₅	37
3.2 Очистка рекомбинантного антимикробного пептида UBI ₁₈₋₃₅ в составе белка-слияния с кетостероидизомеразой и 6-гистидиновым тагом из клеток <i>E.coli</i> Rosetta (DE3) pLysS/ pET31b-2xUBI ₁₈₋₃₅ методом металл- аффинной хроматографии	38
3.3 Отделение рекомбинантного антимикробного пептида UBI ₁₈₋₃₅ от белка-партнера кетостероидизомеразы и 6-гистидинового тага	40
3.4 Очистка рекомбинантного антимикробного пептида UBI ₁₈₋₃₅ методом гельфильтрации с использованием Sephadex G-10.....	41
3.5 Очистка рекомбинантного антимикробного пептида UBI ₁₈₋₃₅ методом гельфильтрации с использованием Bio-Gel P-2	42

3.6 Анализ способности рекомбинантного антимикробного пептида UBI ₁₈₋₃₅ полученного в <i>E.coli</i> Rosetta(DE3) pLysS/ pET31b-2xUBI ₁₈₋₃₅ встраиваться в мембрану микробных клеток.....	44
4 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	48
4.1 Предпроектный анализ.....	48
4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования	48
4.1.2 Сегментирование рынка.....	49
4.1.3 Диаграмма Исикавы.....	50
4.1.4 Оценка готовности проекта к коммерциализации	51
4.1.5 Методы коммерциализации результатов научно – технического исследование	53
4.2 Инициация проекта.....	53
4.2.1 Цели и результат проекта.....	53
4.2.2 Организационная структура проекта.....	54
4.2.3 Ограничения и допущения проекта	55
4.3 планирование управления научно - техническим проектом	56
4.3.1 Иерархическая структура работ проекта.....	56
4.3.2 Контрольные события проекта.....	57
4.3.3 План проекта	58
4.4 Бюджет научного исследования.....	60
4.4.1 Сырьё, материалы, покупные изделия и полуфабрикаты (за вычетом отходов).....	60
4.4.2 Специальное оборудование для научных(экспериментальнх) работ	60
4.4.3 Основная заработная плата	62
4.4.4 Дополнительная заработная плата научно-производственного персонала	64
4.4.5 Отчисления на социальные нужды	64
4.4.6 Научные и производственные командировки.....	65
4.4.7 Накладные расходы	65
4.5 Организационная структура проекта	66
4.6 Матрица ответственности	67

4.7 План управления коммуникациями	68
4.8 Реестр рисков проекта	68
4.9 Оценка сравнительной эффективности исследования.....	69
5 Социальная ответственность	73
Введение	73
5.1 Профессиональная социальная безопасность.....	74
5.1.1 Анализ вредных производственных факторов и обоснование мероприятий по их устранению (производственная санитария)	75
5.1.2 Анализ опасных производственных факторов и обоснование мероприятий по их устранению (техника безопасности).....	81
5.2 Экологическая безопасность	82
5.3 Безопасность в чрезвычайных ситуациях	83
5.3.1 Пожарная и взрывная безопасность.....	84
5.4 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности ...	85
Выводы.....	86
Приложение А	87
Список использованных источников.....	102

Введение

Воспалительные процессы, составляющие патогенетическую основу многих острых и хронических заболеваний несмотря на усовершенствование методов их диагностики и лечения, натекущий момент сохраняют большую медико-социальную значимость.[1] Среди методов медицинской визуализации радионуклидная диагностика занимает лидирующие позиции в индикации воспаления ввиду прямого отображения его патофизиологических аспектов. Такие методы как рентгеновская компьютерная томография (КТ), магнитно-резонансная томография (МРТ), ультразвуковое исследование (УЗИ) позволяют выявлять инфекцию на стадиях значительных анатомических нарушений [2], тогда как использование однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) со специфическими радиофармпрепаратами (РФП) обеспечивает проведение диагностики на начальных этапах развития заболевания, что позволяет не только своевременно начать лечение, но и предотвратить развитие сопутствующих осложнений.[33]

Существует два класса РФП – биораспределение первых определяется только их химическими или физико-химическими свойствами; препараты второй группы представлены системами, распределение которых обеспечивается специфическими взаимодействиями радиоактивно-меченой молекулы с мишенью.[3] Радиофармпрепараты второго класса позволяют проводить дифференциальную диагностику различных заболеваний и патологических состояний, в связи с чем их разработка и получение крайне актуальны для развития современных медицинских технологий.

На сегодняшний день в отечественной ядерной медицине не существует РФП для специфической диагностики микробного воспаления. Одним из перспективных классов молекул для создания эффективных таргетных радиофармпрепаратов для гамма-сцинтиграфии инфекционного воспаления являются антимикробные пептиды (АМП).[4]

Антимикробные пептиды - это гидрофобные, положительно заряженные молекулы, состоящие из 8-20 аминокислотных остатков. В основе их антимикробной активности лежит взаимодействие катионного (положительно заряженного) домена с отрицательно заряженной поверхностью микроорганизма, несущей отрицательно заряженные фосфолипиды, липополисахариды, тейхоевых кислоты.[5] Это взаимодействие обеспечивает целевое накопление пептидов в очагах развития микробной инфекции.[6]

Ранее показано, что АМП - фрагменты убиквицидина (UBI) – меченые радионуклидами проявляют высокую специфичность к бактериальной и грибковой инфекции, при этом чувствительность детектирования достигает порядка 10^4 микробных клеток. Данные пептиды не накапливаются в очагах стерильного воспаления, индуцированного липополисахаридами (ЛПС), терпентиновым маслом или погибшими микроорганизмами.[7] По данным литературы наибольшая селективность к очагам бактериальной инфекции продемонстрирована для фрагментов убиквицидина UBI₁₈₋₃₅ (NH₂-KVAKQEKKKKKTGRAKRR-COOH) и UBI₂₉₋₄₁ (NH₂-TGRAKRRMQYNRR-COOH).

В настоящее время данные пептиды получают преимущественно методом твердофазного пептидного синтеза. Однако, учитывая ряд ограничений твердофазного синтеза, особенно для наработки гидрофобных пептидов длиной более 15 а.к. о., биотехнологический подход получения пептидов представляется крайне привлекательным [34]. Ранее в Центральной научно-исследовательской лаборатории СибГМУ было выполнено клонирование кодирующей пептид UB₁₈₋₃₅ последовательности в плазмиду рЕТ31b(+) (в составе белка слияния с кетостероидизомеразой) и продемонстрирована успешная экспрессия целевого пептида в клетках *E. coli* трансформированных этой плазмидой.

Целью данной работы было разработать методику выделения и очистки рекомбинантного пептида – фрагмента убиквицидина UBI₁₈₋₃₅ (NH₂-

KVAKQEKKKKKTGRAKRR-COOH) и исследовать его функциональную активность. В соответствии с целью работы были сформулированы следующие задачи:

1. Провести экспрессию антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅ в бактериальной системе;
2. Оптимизировать метод очистки рекомбинантного пептида UBI₁₈₋₃₅;
3. Исследовать функциональную активность рекомбинантного пептида UBI₁₈₋₃₅ *in vitro*;
4. Провести анализ экономической эффективности разработки;
5. Оценить экологическую безопасность проведения исследования, условия труда и риски, связанные с проведением исследования.

1 Обзор литературы

1.1 Диагностика гнойных инфекций

Проблема диагностики и терапии гнойных воспалительных инфекций была актуальна во все времена. Инфекция была, есть и в будущем останется важной проблемой хирургии.[8] В тотальной статистике хирургических заболеваний хирургическая инфекция занимает порядка 30-50%. Это объясняется значительным количеством первичных гнойно -воспалительных осложнений после операций, ранений, травм. Подтверждением тому является структура хирургических болезней, изученная Стручковым В.И.:

- 1) инфекция, вызывающая воспалительные процессы --- 35-40 %;
- 2) травма, повреждающая орган-----15-20 %;
- 3) опухоли ----- 15-17 %;
- 4) нарушения кровообращения, вызывающие гангрены --- 4-10 %;
- 5) пороки, требующие коррекции ----- 3-5 %;
- 6) нарушения обмена веществ ----- 3-4 %;
- 7) другие патологические процессы ----- 4-6 %.

Несмотря на применение новых и сильных антибактериальных средств, количество посттравматических, послеоперационных, после раневых инфекционных осложнений не идут к снижению, а сохраняются практически на уровне доантибиотического периода, составляя около 35%. Помимо этого, причиной 43% случаев летальных исходов после операций их являются гнойные осложнения.[8]

Количество гнойных заболеваний в хирургии не уменьшается, и проблема хирургической инфекции занимает важнейшие позиции в ряду клинических и исследовательских задач, стоящих перед современным здравоохранением.

Несмотря на бурное развитие и усовершенствование технической базы, проблема своевременной диагностики хирургической гнойной инфекции остаётся не до конца решённой. Диагностика основанная только на

оценке клинической картины является неудовлетворительно точной, что не допустимо на современном этапе развития хирургии.[9]

Диагностические ошибки приводят к выполнению недостаточно радикальных операций или несвоевременному оперативному лечению, что может вести к увеличению объёма поражения, развитию сепсиса и другим осложнениям.[34]

Остеомиелит до настоящего времени остаётся одним из самых распространённых заболеваний, которое выделяется среди других гнойно-воспалительных процессов тяжестью течения, что затрудняет раннюю диагностику и является причиной высокой частоты неблагоприятных исходов лечения, возникновения осложнений.[9]

Остеомиелит как нозологическая форма включает в себя гнойное воспаление костного мозга (остеомиелит), компактной и губчатой кости (остит), и надкостницы. По этиологии выделяют неспецифический остеомиелит, вызываемый микробами - сапрофитами, и специфический остеомиелита туберкулезного, скарлатинозного, сифилитического паратифозного и другого генеза.[10]

Если возбудители заболевания проникают во внутрь кости из кровеносных сосудов, говорят о гематогенной форме остеомиелита. При негематогенных формах происходит экзогенное микробное загрязнение. При открытых переломах кости, после операций, блокад, инъекций может возникать соответственно посттравматический, послеоперационный и постинъекционный остеомиелит.

Другой механизм поражения кости - распространение инфекции на нее из близлежащих инфицированных тканей при флегмонах, гнойных затеках. При неспецифическом гематогенном и посттравматическом остеомиелите на последних стадиях заболевания различия между ними сглаживаются. [9,10]

Переход острого остеомиелита в хронический можно встретить у 10-45% больных, с дальнейшими рецидивами даже после операций на сердце.

Хронический остеомиелит очень распространенное заболевание, которое охватывает до 10% всех фиксированных больных с гнойной патологией и занимает до 8% в структуре патологии опорно - двигательной системы. В генезе остеомиелита отмечается преимущество механической травмы, в том числе и ятрогенной. [11] Несмотря на достигнутые травматологией за последние десятилетия успехи, частота инфицирования переломов, особенно открытых и развития остеомиелита не имеет тенденции к снижению. В течение последних 10 лет уровень травматизма в нашей стране постоянно возрастает. Ежегодно в Российской Федерации свыше 13 миллионов человек (около 10% населения) получают травмы. Отмечается рост удельного веса тяжелой травмы, множественных, сочетанных и комбинированных повреждений, влекущих за собой появление комплекса симптомов травматической болезни.[12]

Применительно к возникновению посттравматического остеомиелита, считаем уместным, вспомнить выражение Давыдовского И.В. [10]: «Попадание микробов в рану - закономерность, а развитие инфекции в ране — это событие в течение раневого процесса». Инфицирование перелома и даже нагноение костной раны — далеко не всегда является «событием», олицетворяющим остеомиелит. Гнойные процессы в плотной костной ткани развивается чаще на фоне снижения общей реактивности, нарушений гомеостаза, иммуносупрессии макроорганизма, т.е. когда микробы попадают на благодатную почву, «взрыхленную» травматической болезнью.[35]

Для ранней диагностики остеомиелита применяют такие методы как: УЗИ, пункцию кости, термографию, остеотонометрию. Эти методы позволяют обнаружить усиление контуров мягких тканей, реакцию надкостницы в виде «периостального козырька» и очаг деструкции кости. Для ранней диагностики и дифференциальной диагностики с другими заболеваниями высокоинформативными являются компьютерная и магнитно - резонансная томография.[13] Так же для диагностики остеомиелита применяют рентгенологические методы, отражающие структурные

изменения костной ткани в области поражения. Применение остеосцинтиграфии ограничивается ранним распознаванием острого гематогенного остеомиелита, косвенным определением интенсивности воспалительного процесса и дифференциальной диагностикой остеомиелита с другими заболеваниями. Обладая высокой чувствительностью, этот диагностический метод позволяет оценить функциональные изменения в костной ткани еще до появления структурных трансформаций. [13,14]

Для повышения эффективности диагностики гнойной хирургической инфекции предложено много различных инструментальных и лабораторных методов исследования. Одним из таких методов является использование антимикробных пептидов для диагностики септического воспаления.[32]

1.2 Антимикробные пептиды

В настоящее время пептиды (молекулы белковой природы размером от 3 до 50 а.к.о.) широко применяются в диагностических целях. Они обеспечивают высокоспецифичное связывание с клетками-мишенями, но имеют меньшие размеры по сравнению с белками и низкую иммуногенность. Таким образом, пептиды являются перспективными объектами современной молекулярной медицины .[15]

Антимикробные пептиды – это гидрофобные, положительно заряженные молекулы, состоящие из 8-20 аминокислотных остатков. В основе их антимикробной активности лежит взаимодействие катионного (положительно заряженного) домена с отрицательно заряженной поверхностью микроорганизма, несущей отрицательно заряженные фосфолипиды, липополисахариды, тейхоевые кислоты.[16] Это обеспечивает целевое накопление пептидов в очагах развития микробной инфекции.[6]

О существовании АМП известно уже несколько десятилетий, но только недавно интерес к этим молекулам перешел из области фундаментальных исследований иммунной системы в клиническую область. Существуют две основные генетические группы антимикробных пептидов

млекопитающих: кателицидины и дефензины. Все они вырабатываются и функционируют как часть иммунной защиты организма. [35]

Ключевым преимуществом антимикробных пептидов является высокая специфичность и способность связываться только с живыми бактериями.[17] Благодаря способности пептидов встраиваться в мембрану микробной клетки, достигается высокоселективное накопление пептидов в очаге гнойного воспаления, тогда как накопления в стерильном воспалении не происходит.[18]

Первый антимикробный пептид убиквицидин (UBI), относящийся к классу дефензинов, был выделен из макрофагов мыши, позже идентичный пептид был обнаружен в эпителиальных клетках дыхательных путей человека. Ранее было показано, что антимикробные пептиды – фрагменты убиквицидина (UBI) – меченые радионуклидами проявляют высокую специфичность к бактериальной и грибковой инфекции, при этом чувствительность детектирования достигает порядка 10^4 микробных клеток.[35] Данные пептиды не накапливаются в очагах стерильного воспаления, индуцированного липополисахаридами (ЛПС), терпентиновым маслом или погибшими микроорганизмами.[19]

Группа пептидов, полученных из убиквицидина, представляет большой интерес не только для дифференциальной диагностики микробного воспаления, но также для мониторинга эффективности антимикробной терапии. Показана эффективность использования радиоактивно меченых пептидов - производных UBI, у пациентов с остеомиелитом, септическим артритом, бациллемией, медиастинитом после операции на сердце, инфекцией суставов после протезирования, вызванных различными видами патогенных микроорганизмов.[34]

Наиболее перспективными пептидами производными убиквицидина считаются фрагменты UBI₂₉₋₄₁ и UBI₁₈₋₃₅, которые позволяют эффективно визуализировать очаг инфекции при отсутствии неспецифического накопления.[19] Пептид UBI₁₈₋₃₅ демонстрирует более высокую

селективность связывания с микробными клетками *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* в очаге воспаления, поэтому его применение по сравнению с UBI₂₉₋₄₁ является более перспективным. Но, несмотря на это, пептид UBI₁₈₋₃₅ применяется реже, что обусловлено большей сложностью и стоимостью твердофазного синтеза пептида длиной 18 а.к.о. по сравнению с UBI₂₉₋₄₁, имеющим длину 12 а.к.о. [24] В Российской Федерации и за рубежом рекомбинантные аналоги векторного антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅, способного встраиваться в мембрану микробных клеток, а также способы получения пептида UBI₁₈₋₃₅ с использованием технологии рекомбинантных ДНК и микробных штаммов- продуцентов, отсутствуют. Так же антимикробные пептиды могут быть выделены из природных источников.

Наиболее широко для получения пептидов используется метод химического синтеза. Пептид убиквицидин может быть получен методом твердофазного синтеза или с использованием трансгенных животных.[29]

Процесс трансгенеза животных включает выделение зародышевых клеток (зиготы, эмбриональных стволовых клеток, клеток раннего эмбриона), перенос в них чужеродного фрагмента ДНК одним из стандартных способов (эндоцитоз, электропорация, микроинъекция, бомбардировка микрочастицами и, нагруженными рекомбинантной ДНК, инфицирование рекомбинантными вирусами). Далее генетически модифицированные зародышевые клетки животного переносят в матку приемной матери для получения трансгенного организма. Далее пептид или его фрагменты выделяют из тканей или биологических жидкостей организма, например молока. К недостатку метода можно отнести высокую трудоемкость, длительность, высокую стоимость процедуры трансгенеза с последующим отбор (скрининг) трансгенных организмов, а также сравнительно низкие выходы пептида.[43]

В настоящее время существует несколько классификаций антибиотиков, вследствие чего отнесение того или иного антибиотика к определённому классу представляет некоторое затруднение. Эта проблема существует и в отрасли медико-биологической науки, занимающейся АМП,

вследствие чего к АМП иногда относят такие антибиотики, как бактериальные полипептиды, в состав которых входят тиоэфирные аминокислоты, в частности лантионин и метиллантионин и/или остатки жирных кислот.[20]

Антимикробные пептиды, как правило, обладают низкой селективностью; они токсичны как в отношении бактерий, так и в отношении эукариотических клеток (как, например, магаинин и индолицидин).[20] В то же время, некоторые АМП (в частности, псевдины) не обладают гемолитическим эффектом в концентрациях, демонстрирующих антимикробный эффект.

Понимание механизмов узнавания антимикробными пептидами клеток патогенов является необходимым условием для создания лекарственных средств на их основе. Наиболее важным фактором, определяющим селективность АМП, является различие в составе мембран бактериальных и эукариотических клеток. Внешняя поверхность мембран эукариотических клеток состоит из цвиттер-ионных фосфолипидов, в то время как мембраны бактериальных клеток содержат большое количество отрицательно заряженных фосфолипидов как на внутренней, так и на внешней поверхности липидного бислоя.[21] Кислый характер внешней стороны мембран прокариот обуславливает её взаимодействие с преимущественно положительно заряженными АМП. Вторым фактором, обуславливающим селективность АМП, является отсутствие холестерина в мембранах бактериальных клеток. Вследствие этого липидный бислой бактериальных мембран обладает большей текучестью, и образование пор антимикробными пептидами в нем происходит легче, чем в мембранах эукариотических клеток. [20,21] Кроме того, большой отрицательный трансмембранный потенциал на внутренней мембране бактериальных клетках также способствует образованию пор под действием АМП.

Антимикробные пептиды, как правило, являются амфифильными соединениями с ярко выраженными гидрофильной и гидрофобной частью. За

редкими исключениями, молекулы АМП содержат несколько остатков лизина и/или аргинина и при физиологических значениях рН несут положительный заряд.[36] По структуре АМП можно разделить на две большие группы, а именно, циклические пептиды, структура которых обычно поддерживается -S-S- связями, а также линейные пептиды. Последние, в свою очередь, можно разделить на “типичные” пептиды, образующие α -спиральную вторичную структуру, и линейные пептиды, имеющие нетипичную вторичную структуру. Последние, как правило, обогащены остатками Pro, Arg или Trp.[22] При этом большинство пептидов имеют в своей последовательности домены с различной вторичной структурой. Поэтому, когда тот или иной пептид относят, например, к α -спиральному АМП, подразумевается, что в его последовательности преобладают α -спиральные домены. “Типичные” линейные пептиды могут находиться в липидном бислое как в виде α -спирали, так и в виде β -слоев. И β -складчатые, и α -спиральные структуры проявляют амфифильные свойства, причём гидрофобные и гидрофильные участки располагаются по разные стороны остова. Амфифильный характер АМП способствует такому взаимодействию с мембранами, при котором полярные участки пептида взаимодействуют с полярной “головкой” фосфолипида, а гидрофобные участки пептида взаимодействуют с жирнокислотными остатками мембраны путём гидрофобных взаимодействий.[22]

1.3 Твердофазный синтез пептидов

Твердофазный синтез пептидов открыл Р. Б. Меррифилд из Рокфеллеровского университета, который получил за это открытие Нобелевскую премию в 1984 г. Этот метод основывается на фиксации пептида на нерастворимой полимерной подложке с последовательным присоединением остатков аминокислот с защищенными α -амино- и боковыми группами.[23] Полимерная смола на основе 2-хлортритилхлорида, неустойчива к действию кислот. Пространственное строение полимерной

смолы, равно как и умеренная кислотность, необходимая для разрыва связей в цепях, делают смолу полезной для множества применений. Для N- α -защиты аминокислот используют Fmoc-группу, которая неустойчива к действию оснований. После удаления данной защитной группы следующую защищенную аминокислоту добавляют с использованием или связывающего реагента, или предварительно активированного защищенного производного аминокислоты. Конечный пептид присоединен к полимерной матрице через свою C-терминальную группу, причем связь с полимером можно расщепить, получив пептидокислоту или амид (в зависимости от использованного связывающего реагента). Часто для защиты боковых цепей выбирают такие группы, расщепление которых проходит одновременно с отрывом пептида от полимерной матрицы (рисунок 1).[24]

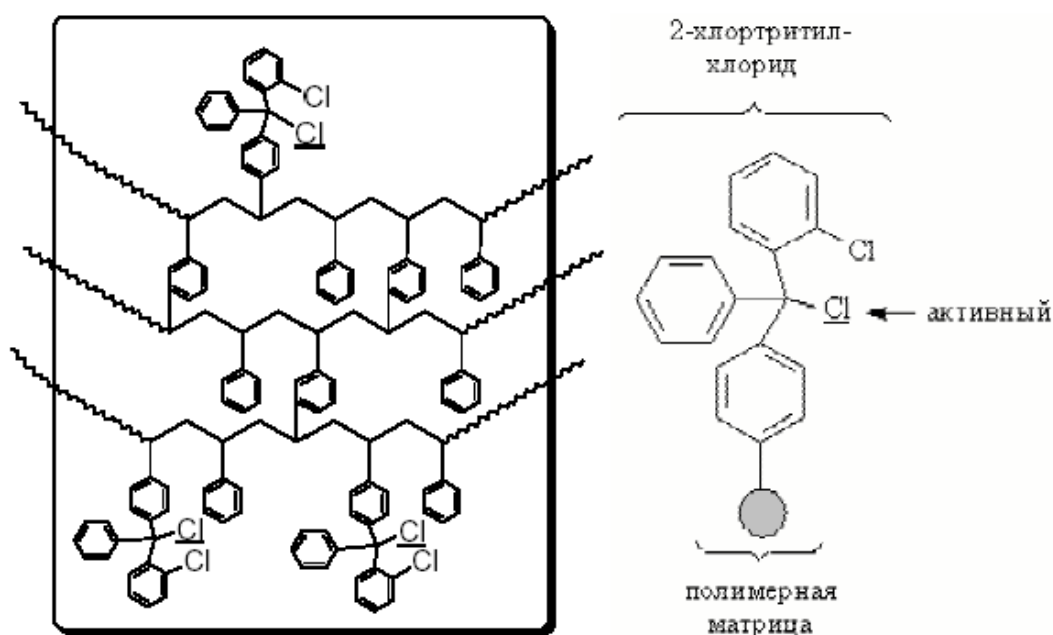


Рисунок 1.1 2-Хлортрифенилхлорид, присоединенный к полимерному носителю – полистиролу, сшитому добавкой 1% дивинилбензола.[24]

Для получения синтетического пептида UBI₁₈₋₃₅ наиболее широко в настоящее время используется твердофазный синтез.[25] Твердофазный синтез начинается со связывания карбоксильной группы защищенной

аминокислоты пептида с соответствующей смолой, обычно через сложноэфирную или амидную связь. Проводят защиту групп боковых цепей аминокислот с помощью различных химических реагентов. Далее следуют повторяющиеся циклы наращивания аминокислотной последовательности, включающие: деблокирование аминогруппы промежуточно-образующей N- терминально защищенной пептидной смолы, активация карбоксильной группы следующей за ней NH₂-защищенной аминокислоты, сочетание аминокислот с формированием пептидной связи. В качестве сочетающего реагента применяют различные используемые в синтезе пептидов активирующие реагенты, например, карбодиимиды.[26] Активированное аминокислотное производное обычно используется в 1,5 – 4-х кратном избытке. В случаях если происходит неполное сочетание, реакцию повторяют. После получения полноразмерной последовательности пептида проводят финальное деблокирование, снятие защиты с боковых групп аминокислот и отщепление готового пептида от смолы, например, с помощью трифторуксусной кислоты.[30]

Пептидный синтез широко используется 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 диагностических систем и вакцин.[27] Однако, получение необходимого количества пептида, особенно гидрофобного и / или с длинной последовательности более 15 а.к.о. методом твердофазного синтеза имеет ряд ограничений [28], 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 аминокетуппы; а также высокая стоимость синтеза. Дополнительным негативным фактором химического синтеза является применение в работе токсичных растворителей и реагентов.[29]

Ограничениями метода твердофазного синтеза для получения пептидов является его высокая стоимость и токсичность используемых реагентов, а так же загрязнение целевого продукта продуктами побочных реакций и сложность очистки целевого пептида в связи с тем, что побочные продукты имеют схожую природу.

Более выгодным с экономической точки зрения представляется генно-инженерный способ получения пептидов. Однако важно отметить, что рекомбинантная технология получения антимикробных пептидов требует тщательного подбора вектора, штамма-продуцента, а также оптимизации условий экспрессии и очистки целевого пептида.[28]

1.4 Обзор методов очистки белков и пептидов

Оптимизация метода очистки белка или пептида направлена в первую очередь на получение продукта с высокой частотой при условии минимизации стоимости процедуры очистки. В связи с этим часто использование относительно простых методик очистки позволяет достичь требуемый результат.[31]

Наиболее часто при работе с белками, пептидами используют следующие приемы:

Концентрирование. Концентрирование проводят, осаждавая белок из разбавленного раствора и растворяя полученный осадок в меньшем объеме. Наиболее часто применяют ацетон или сульфат аммония. При этом концентрация белка в первоначальном растворе должна составлять не менее 1 мг/мл. Также используют адсорбцию белков из сильно разбавленных растворов с применением ионообменника, элюируя его в дальнейшем малыми объемами солевых растворов. Для ускорения процедуры концентрирования белковых растворов применяют такие водоотнимающие средства, как сухой гель фильтрующий носитель (сефадекс), высокозамещен

ную карбоксиметилцеллюлозу или полиэтиленгликоль (ПЭГ).[37] Образец помещают в диализный мешок, который погружают в порошок, поглощающий воду. Наиболее эффективным подходом к концентрированию белков является *ультрафильтрация*, основанная на использовании полупроницаемых мембран с определенными размерами пор, не позволяющих белку выйти из мембраны.

Диализ.

Во время диализа из раствора белка удаляются вещества молекулярной массой меньше размера пор диализной мембраны.

Чаще всего используют для диализа целлофановую мембрану. В продаже имеются диализные трубки различного диаметра, с размером пор от 500 до 100000 Да и более. Для более эффективного удаления низкомолекулярных веществ во время диализа необходима частая смена буферного раствора в диализате. Диализ является длительной процедурой, обычно его ставят на ночь. В зависимости от белкового раствора диализ может, длиться несколько суток и в течение этого времени необходима смена буферного раствора. [38]

Тепловая денатурация. На начальном этапе очистки для разделения белков редко используют тепловую обработку. Она эффективна, в тех случаях, когда белок относительно устойчив в условиях нагревания, в то время как другие белки денатурируют. При этом изменяют рН раствора, температуру и время обработки. Для выбора подходящих условий предварительно проводят серию из нескольких небольших опытов. После первых этапов очистки белки далеки от однородного состояния. В полученной смеси белки отличаются друг от друга молекулярной массой, стабильностью, растворимостью, величиной суммарного заряда молекулы, и т.д. Эти различия и могут быть положены в основу методов дальнейшего разделения белков.[39] Очистка белка – процесс многоступенчатый и на каждой ступени мы получаем фракцию более богатую выделяемым белком,

чем на начальной стадии. Чаще всего этот процесс называют фракционированием.

Осаждение белков органическими растворителями.

Этот метод является одним из наиболее старых методов и занимает немаловажную роль в очистке белков в промышленных масштабах. Наиболее распространенными растворителями являются метанол, диоксан, ацетон и этанол, реже используют – изопропанол. Суть метода заключается в уменьшении способности воды к сольватации заряженных гидрофильных молекул белка по мере увеличения концентрации органического растворителя. Происходит уменьшение растворимости белка и, как следствие, агрегация и осаждение. Одним из самых важных критериев, влияющих на осаждение, является размер белковой молекулы.[38,39] Размер молекулы белка обратно пропорционален концентрации органического растворителя, вызывающего осаждение белка.

Применяемый растворитель должен обладать хорошим осаждающим действием, полностью смешиваться с водой и не реагировать с белками. Одно из преимуществ метода фракционирования с помощью органических растворителей заключается в том, что его можно проводить при температуре ниже нуля, так как все смешивающиеся с водой растворители образуют смеси, замерзающие при температуре значительно ниже 0°C. Это очень важное свойство, так как в ходе фракционирования необходимо поддерживать низкую температуру.[40] Наиболее часто для осаждения белков используется ацетон. Он обладает меньшим денатурирующим действием, чем этанол, отчасти потому, что при минусовой температуре требуются несколько более низкие его концентрации, чтобы получить такое же осаждение, как и при использовании этанола. Он также более летуч, что позволяет легко удалять его из растворенного осадка при пониженном давлении.

Методика осаждения состоит в следующем: образец обычно охлаждают до 0° С в ледяной бане со льдом. Концентрация белка может быть

5-30 мг/мл, а концентрация соли не должна быть высокой. Высокая концентрация соли снижает электростатическую агрегацию, и требуются более высокие концентрации растворителя, что увеличивает вероятность денатурации. При низкой концентрации соли может образоваться тонкая взвесь, которую трудно осадить. Оптимальная концентрация соли – 0,05-0,2 М. Растворитель добавляют медленно, чтобы избежать разогрева. Большинство белков осаждаются при добавлении 20-50% растворителя (по объему).[41] После уравнивания смеси в течение 10-15 минут осадок отделяют центрифугированием. Затем осадок растворяют в холодном буфере. Обычно объем буфера в 2 раза превышает объем осадка. Небольшие количества органического растворителя (около 10% по объему) не мешают дальнейшему фракционированию.

Если температура при фракционировании органическими растворителями высока, происходит денатурация белка. Однако некоторые ферменты обладают высокой стабильностью, и денатурация носит избирательный характер.[39,41]

Гель – фильтрация.

С помощью метода гельфильтрации можно быстро разделить макромолекулы в соответствии с их размерами. Носителем для хроматографии является гель, который состоит из поперечно-сшитой трехмерной молекулярной сетки, сформированной в виде шариков (гранул) для удобства наполнения колонок. Так *сефадексы* - это поперечно-сшитые декстраны (α -1 \rightarrow 6-глюканы микробного происхождения) с заданными размерами пор. Сшиты цепи декстрана трехуглеродными мостиками с помощью эпихлоргидрина.[41]

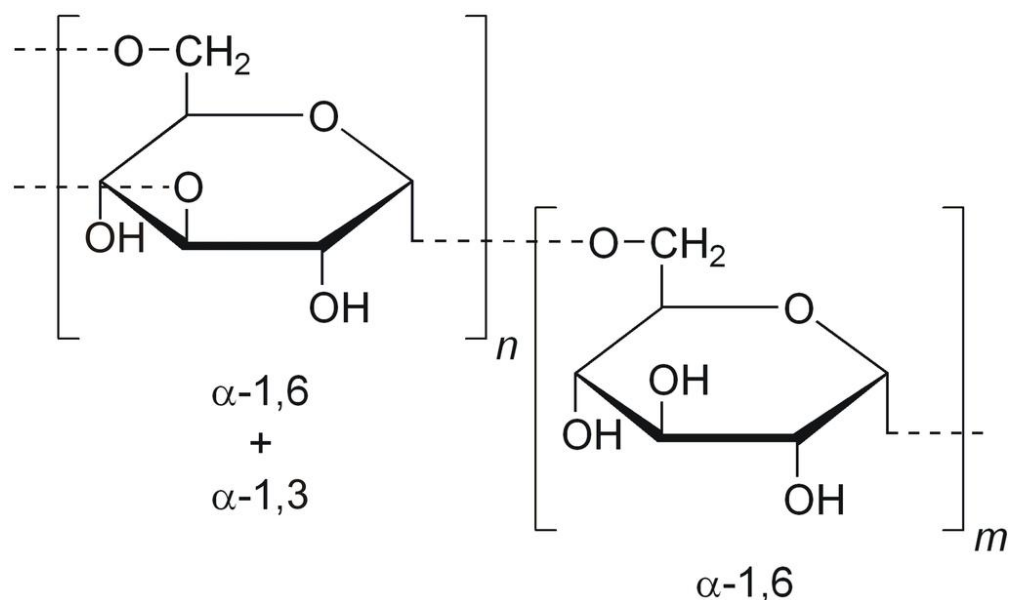


Рисунок 1.2. Структура декстрана. [41]

Чем больше поперечных сшивок, тем меньше размеры отверстий. Полученный таким образом гель играет роль молекулярного сита. При пропускании раствора смеси веществ через колонку, наполненную набухшими гранулами сефадекса, крупные частицы, размер которых превышает размер пор сефадекса, будут двигаться быстро. Мелкие молекулы, например, соли, будут двигаться медленно, поскольку в процессе движения они проникают внутрь гранул. Колонка, наполненная сефадексом, характеризуется общим объемом V_0 , который складывается из внутреннего объема V_B , находящегося внутри гранул, объема наружного V_H , занимающего пространство между гранулами, и объема V_M , отражающего массу геля, и может быть рассчитано по формуле (1):

$$V_0 = V_B + V_H + V_M \quad (1)$$

Распределение вещества между внутренним и внешним объемами характеризуется коэффициентом распределения K_p , определяемым по формуле (2):

$$K_p = \frac{V_э - V_H}{V_B} \quad (2)$$

Если вещество не проникает внутрь глобул, объем элюции равен наружному объему и $K_p = 0$. Если же вещество равномерно распределено

внутри гранул и между ними, объем элюции равен сумме внутреннего и наружного объемов и $K_p=1$.

Существуют различные марки сефадексов, отличающиеся размером пор, обозначаемые как G-10, 15, 25, 50, 75 и т.д. Чем меньше номер, тем больше число поперечных сшивок содержит молекула, тем меньше воды поглощает гранула при набухании. С ростом номера марки сефадекса растут поры гранул и увеличиваются границы молекулярной массы веществ, способных проникать внутрь гранул, а, следовательно, и способных к разделению. Каждая марка сефадекса выпускается с различной величиной частиц: сверхтонкий, тонкий, средний и грубый. Как правило, в аналитической работе используются сверхтонкий и тонкий, а в препаративной - средний и грубый.[42]

Кроме сефадексов для гельфилтрации белков используют сополимеры акриламида с бисакриламидом, получившие название *биогелей* (P-2, P-4, P-6 и т.д.), и сефарозу – поперечно-сшитую агарозу (агароза - это нейтральный компонент агара). Все они делят белки по размеру молекул, как и сефадексы.

Основная проблема, связанная с использованием сефадекса и полиакриламида, заключается в мягкости их гранул. Даже очень слабое давление, возникающее в колонке во время хроматографии, вызывает деформацию гранул. Этим недостатком лишены *сефакрилы* – декстраны, содержащие дополнительные поперечные сшивки, образованные бисакриламидом. Эта новая продукция фирмы Amersham Bioscience вытесняет даже наиболее жесткие поперечно-сшитые агарозы, такие как CL-сефарозы.[39,42]

Наиболее важные рекомендации: размеры колонки должны в 30-100 раз превышать объем наносимого образца, концентрация белка в образце - составлять 10-20 мг/мл, длина колонки - в 20-40 раз превышать ее диаметр.

Таблица 1.1. Некоторые наиболее распространенные сорбенты для гельфильтрации и области их применения

Фирменное название геля, производитель	Тип геля	Область разделения по относительной молекулярной массе (для глобулярных белков)
Сефадексы G-10*	Декстран	-700
<i>Amersham Bioscience</i> G-15	«	-1 500
G-25	«	1 000-5 000
G-50	«	1 500-30 000
G-75	«	3 000-70 000
G-100	«	4 000-150 000
G-150	«	5 000-400 000
G-200	«	5 000-800 000
Био-гели P-2	Полиакриламид	200-2 6000
<i>Bio-Rad</i> P-4	«	500-4 000
P-6	«	1 000-5 000
P-10	«	5 000-17 000
P-30	«	20 000-50 000
P-60	«	30 000-70 000
P-100	«	40 000-100 000
P-150	«	50 000-150 000
6В Сефарозы	Агароза	$-2 \cdot 10^6$
<i>Amersham Bioscience</i> 4В	«	300 000- $20 \cdot 10^6$
2В	«	$2 \cdot 10^6$ - $25 \cdot 10^6$
CL-6В	Поперечно-	10 000- $4 \cdot 10^6$
CL-4В	сшитая	60 000- $20 \cdot 10^6$
CL-2В	агароза	70 000- $40 \cdot 10^6$
Сефакрилы S-300	Декстран/ бис-	10 000-800 000
<i>Amersham Bioscience</i> S-400	акриламид	20 000- $2 \cdot 10^6$

Методы гель-фильтрации часто используют для удаления солей из раствора белка и замены буфера. Подбор условий проводится для каждого

белка индивидуально (Таблица 1.2).

Таблица 1.2 Параметры колонок с Sephadex G-25,G-10 для обессоливания белковых растворов

Размеры колонки	Тип носителя	Объем колонки, см ³	Объем образца, см ³	Скорость потока, мл·ч ⁻¹	Время процесса, мин
1×8	Тонкий	8	1-1,5	40	7
6×10	Средний	60	2-10	200	15
8×30	Средний	240	10-30	250	30
8×60	Средний	480	30-80	250	45
16×90	Грубый	1440	80-300	500	90

2 Объект, методы и материалы исследования

2.1 Объект исследования

Объектом исследования является технология получения рекомбинантного антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅, предназначенного для диагностики септического воспаления.

2.2 Материалы

2.2.1 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 (Biograd), система гель- документирования (G:BOX Chemi; XT4), аналитические весы (Adventure), электроблоттер (SD20 Semi Dry Maxi, Cleaver), лиофильная сушка (Labconco FreeZone), проточной цитофлуориметр BD Accuri C6 (BD Bioscience, CA).

2.2.2 Рабочие материалы

Одноразовые пластиковые наконечники (200 мкл, 1000 мкл, 10 мл), одноразовые пластиковые чашки Петри, эппендорфы (0,5 мл, 1,5 мл, 2,5 мл), пластиковые пробирки (15 мл, 50 мл).

2.2.3 Расходные материалы

Штамм *Escherichia coli* Rosetta (DE3) pLysS pET31 (b+)- UBI₁₈₋₃₅ (из коллекции штампов ЦНИИЛ СибГМУ, Томск), штамм *Staphylococcus aureus*, ампициллин – 50 мг/мл, рабочая концентрация 1:1000.

Изопропил-бета-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (Helicon), набор белковых маркеров M35 (СибЭнзим), набор низкомолекулярных белковых маркеров (Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder, Thermo Scientific), муравьиная кислота (Fluka), Sephadex G-10 (Bio-Rad), Bio-gel P2 (Bio-Rad), Cyanine5-ester-NHS (Lumiprobe), Syber Green I (Thermo Scientific).

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

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; 5x буфер для проб (62,5 мМ трис-НСl, рН 6.8, 20% глицерин, 2% SDS, 5% β-меркаптэтанол); 1x 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); ледяная уксусная кислота, 10% (v/v) изопропанол, отмывочный раствор (7% (v/v)).

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 8.25), 0,1% SDS); буфер для геля (3 М трис-НСl, рН 8.45); сток акриламида (АА концентрирующий) (48% акриламида, 1.5% бис- акриламида); сток акриламида АА разделяющий (46,5%

акриламида, 3,0% бис-акриламида); 2х буфер для внесения 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).

Буферы для очистки пептида в составе белка-слияния методом металл-аффинной хроматографии: ресуспендирующий буфер (50 мМ трис НСl, 100 мМ NaCl, рН 8.0); раствор лизоцима (10 мг/мл); лизирующий буфер (40 мМ трис-НСl, 500 мМ NaCl, 15 мМ имидазол, 8 М мочевины, рН 8.0); элюирующий буфер (40 мМ трис-НСl, 500 мМ NaCl, 300 мМ имидазол, 8 М мочевины, рН 8.0).

Буферы для отмывки телец включения: отмывочный (50 мМ трис, 1% Triton-X100, 100 мМ NaCl, 10 мМ DTT, рН 8.0); раствор лизоцима (10 мг/мл); промывочный буфер (50 мМ трис, 100 мМ NaCl, рН 8.0) с добавлением 2 М NaCl или 1 М мочевины.

Буфер для нанесения на колонку: 20 мМ Tris-НСl, 50 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂.

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

2.3 Методы

2.3.1 Приготовление сред

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

Жидкая среда LB-Broth: 25 г среды LB-Broth разводили в 1 л дистиллированной воды. Для обеспечения селективности в 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 питательных сред проводили в стеклянных колбах, закрытых фольгой, в течение двух- трех часов при температуре 110 °С.

Предварительно прогретую, полностью растворённую при 110 °С среду LB- агар разливали по чашкам с добавлением антибиотика в концентрациях, указанных ранее, чашки хранятся не более двух недель при 4 °С, в холодильнике, запечатав их в парафиновой плёнке.

2.3.2 Индукция экспрессии пептида UBI₁₈₋₃₅ в составе белка – слияния с кетостероидизомеразой (KSI)

Рекомбинантный штамм pET31(b+)-UBI₁₈₋₃₅ высевали на чашку с агаризованной LB- средой и выращивали в течение ночи при 37 °С. Затем одну колонию с чашки переносили в 5 мл LB среды, содержащей ампициллин, и выращивали в течение ночи на качалке при 37 °С. 500 мкл ночной культуры переносили в 50 мл LB-среды, которая содержала 50 мкг/мл ампициллина и 1% глюкозу для подавления базального уровня экспрессии с T7-промотора, и инкубировали на качалке при 37 °С, 180 rpm, 3 часа (до достижения $OD_{600}=0,6$). Затем вносили ИПТГ до конечной концентрации 0,1 mM, белок экспрессировали в течение 4 часов при 28 °С. По окончании индукции пробы центрифугировали при 5000 g в течение 20 мин при 4°С. Культуральную жидкость удаляли, осадок замораживали. Отбирали пробы для анализа методом SDS-ПААГ-электрофореза.

2.3.3 Электрофорез белков в полиакриламидном геле

SDS-ПААГ-электрофорез проб проводили по стандартной методике 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. Далее гель фиксировали в течении 30 минут в ТХУ(трихлоруксусная кислота), полосы белков выявляли при помощи окрашивания 0,25% (w/v) Кумасси R-250, и далее гель замачивали в отмывочном растворе (50 мл ледяной уксусной кислоты, 50 мл изопропанола и деонизированная вода до 500 мл) на ночь, после этого гель фотографировали с использованием гель-

документирующей системы G-Vox и обрабатывали полученные электрофореграммы в программе GeneTools.

2.3.4 Отмывка телец включения KSI-2xUBI₁₈₋₃₅

Осадок после индукции и заморозки на минус 80°C растворяли в отмывочном буфере (на 1 г осадка добавляли 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 (Bandelin Sonopuls). После инкубировали во льду 20 минут, пробы центрифугировали 20 минут, 10000 гpm при 4 °C. Промывали промывочным буфером, центрифугировали 20 минут, 10 гpm, 4 °C. Промывали 2 М NaCl, центрифугировали 20 минут, 10000 гpm, при 4 °C. Осадок растворяли в 1 М мочеvine, инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Промывали промывочным буфером. Центрифугировали 20 минут, 10000 гpm при 4 °C. Осадок растворяли в лизирующем буфере, инкубировали на шейкере в течение ночи при комнатной температуре. Центрифугировали 20 минут, 10000 гpm при 4 °C. Собирали супернатант, содержащий растворенный белок-слияния KSI-2xUBI₁₈₋₃₅ (осветленный лизат), и анализировали пробы методом SDS-ПААГ электрофореза.

2.3.5 Аффинная хроматография (очистка на Ni-NTA агарозе)

Выделение целевого белка осуществляли методом металл-хелатной аффинной хроматографии. Белок элюировали с колонки специфической элюцией с применением имидазола, который обладает большим сродством к хелатированным ионам металла по следующей методике.

Необходимый объем Ni-NTA определяли, исходя из ориентировочной оценки количества целевого белка в лизате по данным электрофореза и спектрофотометрии. Ni-NTA агарозу помещали в колонку с диаметром 30 мм и длиной 145 мм с плотно закрытым колпачком. Далее промывали колонку 4x кратным избытком лизирующего буфера от объема Ni-NTA. Наносили осветленный лизат на колонку. Отбирали фракцию белков, не связавшихся с сорбентом, отбирали 25 мкл для анализа методом SDS-ПААГ электрофореза.

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

2.3.6 Диализ

Полученный после очистки на Ni-NTA-агарозе препарат белка диализировали против дистиллированной воды в течение двух суток (с заменой буфера каждые 24 часа). После диализа очищенный белок замораживали на –80 °С для последующей лиофилизации.

2.3.7 Химическое отщепление UBI₁₈₋₃₅ от белка партнера с использованием CNBr

Лиофилизированный (FreeZone 1 Labconco, USA) белок-слияния KSI-2xUBI₁₈₋₃₅ растворяли в минимальном количестве 75% водного раствора муравьиной кислоты и добавляли 100 молярный (по отношению к остаткам метионина) избыток CNBr. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение ночи в темноте. Реакцию прекращали добавлением воды в 10-кратном избытке (по объему). Затем пробу замораживали при минус 20 °С и лиофилизировали. Эффективность отщепления пептида от белка-слияния оценивали при помощи SDS-ПААГ-трицин электрофореза.

2.3.8 Электрофорез низкомолекулярных белков и пептидов

Электрофорез низкомолекулярных белков и пептидов (SDS-ПААГ-трицин электрофорез) проводили в течение 40 минут при силе тока 38 мА, и далее в течение 5 часов и силе тока 15 мА, напряжение электрического поля составляло 100 В.

После окончания электрофореза гель фиксировали в растворе для фиксации геля в течение 30 минут. После фиксации гель окрашивали раствором для окрашивания геля в течение 40 минут. 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-Vox и обрабатывали в программе GeneTools.

2.3.9 Гель – фильтрационная хроматография (Bio-Gel P 2)

Пептид UBI₁₈₋₃₅ очищали из смеси белок-пептид после расщепления с помощью гель-фильтрационной хроматографии (SEC). Колонка с внутренним диаметром 30 мм и высотой 145 мм была заполнена Bio-Gel P 2, в соответствии с инструкцией поставщика. Смесь после расщепления наносили на предварительно уравновешенную буфером с мочевиной колонку (50 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 8 M мочевины, pH 8,0) в максимальном количестве 5% от объема колонки. Пептид элюировали с колонки равномерным потоком буфера (50 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 8 M мочевины, pH 8,0) со скоростью 3 мл / мин в течение 50 мин (NGC™, BioRad).

Фракцию, содержащую UBI₁₈₋₃₅, собирали и диализировали (Slide-A-Lyzer, 2000 MWCO, Pierce) против воды. Все хроматографические фракции (аналитические и препаративные) были высушены и проанализированы с использованием трицин-ПААГ электрофореза.

2.3.10 Гель – фильтрационная хроматография (Sephadex G-10)

Полученные после химического отщепления пептида от белка-партнера пробы разделяли с использованием гель-фильтрационной колонки Sephadex G-10 согласно инструкции фирмы-производителя. Для этого Sephadex G-10 смешивали с буфером (20 mM трис; 150 mM NaCl) в соотношении 1:3 (w:v). Далее ставили на водяную баню и выдерживали в течение 2 часов при температуре 90 °C, после чего заполняли колонку длиной 10 см, и внутренним диаметром 1 см.

Промывали колонку 8 объемами буфера (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl₂), затем наносили пробу (0,4 объема от объема сорбента в колонке), давали стечь жидкости, отбирали фракцию для анализа. Далее пептид элюировали буфером для нанесения, фракции собирали и анализировали при помощи трицин-ПААГ электрофореза.

Фракции содержащие целевой пептид соединяли и лиофилизировали.

2.3.11 Анализ функциональной активности рекомбинантного пептида

Для анализа способности рекомбинантного антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅, полученного в *E.coli* Rosetta (DE3) pLysS/ pET31b-2xUBI₁₈₋₃₅ встраиваться в мембрану микробных клеток, рекомбинантный антимикробный пептид UBI₁₈₋₃₅ метили флуоресцентной меткой Cyanine5. Для этого 2 мг лиофилизованного рекомбинантного антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅ растворяли в 450 мкл 0,1 М натрий-фосфатного буфера (pH 8.4) и смешивали с 5 мг Cyanine5-ester-NHS (Lumiprobe), растворенного в 50 мкл ДМСО, и инкубировали на ротаторе (Multi RS-60, BioSan) при 4 °С в течение ночи в темноте. После инкубации диализовали против 0,1 М натрий-фосфатного буфера, используя Slide-A-Lyzer, 2000 MWCO (Pierce).

Для исследования связывание Cyanine5-UBI₁₈₋₃₅ с микробными клетками 30 мкл Cyanine5-UBI₁₈₋₃₅ (1 mM) в натрий-фосфатном буфере (pH 7.4) добавляли к 420 мкл натрий-фосфатного буфера (pH 7.0), содержащего 0,01% (v/v) Tween-80, и смешивали с 50 мкл натрий-фосфатного буфера (pH 7,0) содержащего 10⁶ микробных клеток *S. aureus*. Смесь инкубировали на ротаторе при 4 °С в течение 1 часа в темноте, центрифугировали при 3000 g 5 минут. Супернатант удаляли, дважды промывали осадок клеток, и растворяли в 200 мкл натрий-фосфатного буфера (pH 7.4).

Клетки анализировали методом проточной цитометрии (BD Accuri C6, BD Bioscience, CA). Дополнительно клетки окрашивали с использованием флуоресцентного красителя Syber Green I.

Статистический анализ данных выполнен в программе IBM SPSS Statistics. Данные, подчиняющиеся нормальному распределению представлены как среднее \pm стандартное отклонение. На нормальность распределения данные проверены с использованием теста Шапиро-Уилкса.

2.3.12 Определение концентрации белка методом Брэдфорда

Определение концентрации белка проводили методом Брэдфорда. Принцип метода основан на взаимодействии красителя Кумасси - G250 с белком, преимущественно с аргинином и гидрофобными аминокислотными остатками. Измерения оптической плотности проводили на сканирующем спектрофотометре Unicо 2800 при длине волны 595 нм. Для построения калибровочной кривой в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин, фракция V (Sigma).

4 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение

Воспалительные процессы, составляющие патогенетическую основу многих острых и хронических заболеваний, несмотря на улучшение их диагностики и лечения, на сегодняшний день сохраняют высокую медико-социальную значимость. Среди методов медицинской визуализации радионуклидной диагностике принадлежат лидирующие позиции в индикации воспаления ввиду прямого отображения его патофизиологических аспектов. В магистерской диссертации изучается диагностика септического воспаления с использованием антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅.

С точки зрения фундаментальной науки реализация данного проекта позволит внести значительный вклад в решение актуальных научных проблем тонкого органического синтеза, развития подходов получения векторных молекул и диагностических систем на их основе.

В настоящее время в отечественной ядерной медицине не существует радиофармпрепаратов для специфической диагностики микробного воспаления. Сцинтиграфия с антимикробными пептидами ранее в России не применялась, а процедура биотехнологического синтеза пептидов из группы UBI, равно как и получения пептидов UBI, содержащих D-аминокислоты, меченых их ^{99m}Tc не разработана.

Важно подчеркнуть актуальность получения отечественных радиофармпрепаратов, учитывая высокую потребность у населения в проведении сцинтиграфической диагностики и относительно короткие сроки «жизни» меченых ^{99m}Tc препаратов.

4.1 Предпроектный анализ

4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Отличительной чертой российского рынка медицинских диагностических услуг является превалирующая государственная форма собственности: на данный момент государственные учреждения

контролируют порядка 90% рынка диагностических услуг. Тем не менее, в настоящее время Правительством РФ проводится серьезная работа по созданию нормативно-правовой базы в сфере обращения медицинских изделий. Другая характерная особенность — высокие показатели, которые демонстрирует динамика развития рынка платных медицинских диагностических услуг. На долю медицинской диагностики среди сегментов рынка частной медицины в России приходится около 10% рынка, более того, как показали данные исследования Index Vox, прирост рынка платной лабораторной диагностики составляет ежегодно почти 50%.

Доступность диагностических услуг в России и странах Центральной и Восточной Европы ограничена для населения, что рождает ряд проблем, особенно для коммерческих лечебных учреждений. Альтернативные модели финансирования, предлагаемые поставщиками медицинского оборудования, а также поддержка частно-государственного партнёрства на национальном уровне будут стимулировать рост на этом рынке.[57]

4.1.2 Сегментирование рынка

К наиболее развитым сегментам российской биофармацевтики относятся:

- Цитокины (интерфероны, эритропоэтины)
- Гормоны (инсулины, соматропин, группа половых гормонов)
- 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%). [58]

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.

4.1.3 Диаграмма Исикавы

Диаграмма причины-следствия Исикавы (Cause-and-Effect-Diagram) - это графический метод анализа и формирования причинно-следственных связей, инструментальное средство для систематического определения причин проблемы и последующего графического представления. Область применения диаграммы:

Выявление причин возникновения проблемы;

Анализ и структурирование процессов на предприятии;

Оценка причинно-следственных связей.

Сначала формулируется существующая проблема, или дефект качества. Главные категории потенциальных причин – это оборудование, материалы, человек, процессы, менеджмент, измерительные средства и т. д. Для каждой главной категории на диаграмму наносятся все вероятные причины проблемы. Диаграмма Исикавы представлена на рисунке 4.1.

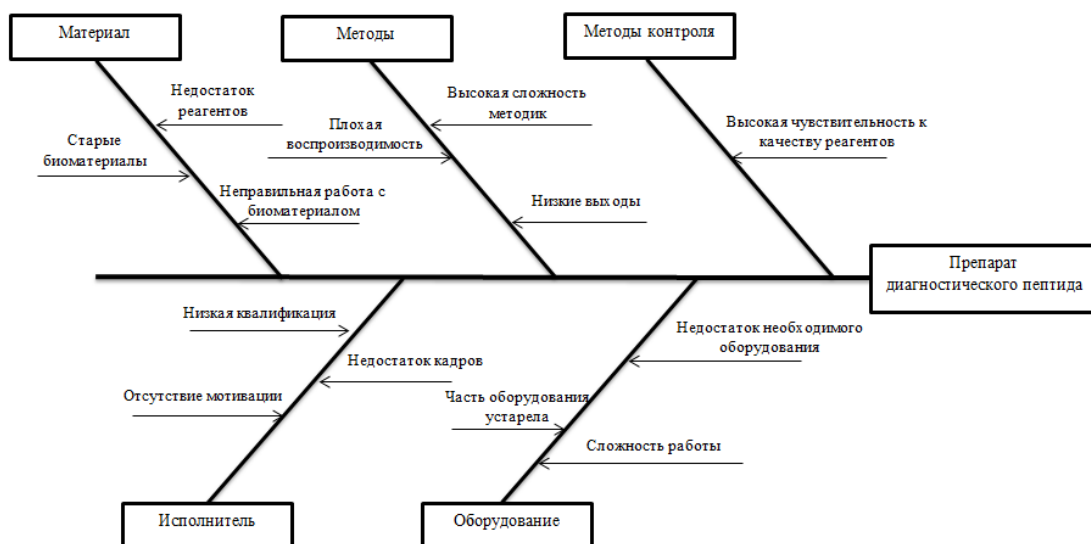


Рисунок 4.1 Диаграмма Исикавы

4.1.4 Оценка готовности проекта к коммерциализации

На каждой стадии жизненного цикла научной разработки необходима оценка степени её готовности к коммерциализации, а так же выяснение уровня знаний разработчика для её проведения и завершения. С этой целью была заполнена специальная форма, содержащая показатели о степени проработанности проекта с позиции коммерциализации и компетенции разработчика научного проекта (таблица 1).

Таблица 4.1 Оценка готовности проекта к коммерциализации.

Наименование	Степень проработанности проекта	Уровень знаний у разработчика
Определён имеющийся научно-технический задел	4	4
Определены перспективные направления коммерциализации научно-технического задела	4	4

Продолжение таблицы 4.1

Определены отрасли и технологии (товары, услуги) для предложения на рынке	5	4
Определена товарная форма научно-технического задела для представления на рынок	4	4
Определены авторы и осуществлена охрана их прав	3	3
Проведена оценка стоимости интеллектуальной собственности	3	3
Проведены маркетинговые исследования рынков сбыта	3	3
Разработан бизнес-план коммерциализации научной разработки	2	2
Определены пути продвижения научной разработки на рынок	3	2
Разработана стратегия (форма) реализации научной разработки	5	4
Проработаны вопросы международного сотрудничества и выхода на зарубежный рынок	4	3
Проработаны вопросы использования услуг инфраструктуры поддержки, получения льгот	3	2
Проработаны вопросы финансирования коммерциализации научной разработки	2	2
Имеется команда для коммерциализации научной разработки	3	3
Проработан механизм реализации научного проекта	4	4
Итого баллов	52	47

Оценка готовности научного проекта к коммерциализации (или уровень имеющихся знаний у разработчика) определяется по формуле:

$$B_{\text{сум}} = \sum B_i \quad (4.1)$$

$B_{\text{сум}}$ — суммарное количество баллов по каждому направлению;
 B_i — балл по i -му показателю.

Значение $B_{\text{сум}}$ для проработки составило 52 балла, для уровня знаний разработчика — 47, следовательно, перспективность разработки выше среднего. Слабыми местами проекта являются бизнес-план и вопросы

финансирования коммерциализации. Решением этой проблемы может стать повышение экономических компетенций разработчиков или включение в проектную группу экономиста.

4.1.5 Методы коммерциализации результатов научно – технического исследование

Коммерциализацию исследования планируется осуществлять с использованием метода продажи патентной лицензии. Производство конечного продукта на коммерческой основе требует масштабирования процесса получения препарата, что сопряжено со значительными финансовыми затратами, а так же требует наличия собственных производственных линий. Следовательно, наиболее простым способом коммерциализации проекта является продажа лицензии.

4.2 Инициация проекта

На стадии инициации проекта определяются начальные финансовые ресурсы, а так же круг внешних и внутренних заинтересованных сторон проекта, их взаимодействие и влияние на общий результат научного исследования.

4.2.1 Цели и результат проекта

В данном разделе определяются заинтересованные стороны проекта, иерархия целей проекта и критерии их достижения. Данная информация приведена в таблицах 4.2-4.3.

Таблица 4.2 Заинтересованные стороны проекта.

Заинтересованные стороны проекта	Ожидания заинтересованных сторон
Научный руководитель	Методика получения пептида с использованием микробиологических методов, патентная защита технологии получения пептида
Магистрант	
Предприятие-производитель	Более выгодная по сравнению с существующей методика получения диагностического агента

Таблица 4.3 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 приёмки результата проекта:	<p>препарат не оказывает выраженного цитотоксического действия <i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - 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

4.2.2 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 (таблица 4.4).

Таблица 4.4 Состав рабочей группы, выполняющей проектное исследование.

п/п	ФИО, основное место работы, должность	Роль в проекте	Функции	Трудо-затраты, час.
	Першина Александра Геннадьевна	Научный руководитель	Осуществление детального планирования проекта, курирование выполняемых работ	360 часов

Продолжение таблицы 4.4

	Киржаева Любовь Сергеевна	Исполнитель-магистрант	Выполнение всех работ по проекту	2920 часов
	Кривошеков Сергей Владимирович	Внешний специалист-хроматографист	Консультирование и проведение работ по выделению пептида из смеси	360 часов
	Креницына Зоя Васильевна	Консультант раздела «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»	Курирование выполнения раздела «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение» в магистерской диссертации	12 часов
	Ахмеджанов Рафик Равильевич	Консультант раздела «Социальная ответственность»	Курирование выполнения раздела «Социальная ответственность» в магистерской диссертации	12 часов
Итого				3904 часа

4.2.3 Ограничения и допущения проекта

К ограничениям проекта относят факторы, служащие ограничением степени свободы участников команды проекта, а так же временные границы и параметры проекта или конечного продукта, которые не подлежат реализации в рамках данного проекта.

Таблица 4.5 Ограничения и допущения проекта.

Фактор	Ограничения/ допущения
Бюджет проекта	5 млн. руб.
Источник финансирования	Гос. Задание, гранты
Сроки проекта:	с 2.09.2014 по 31.06.2019 г
Дата утверждения плана управления проектом	30.09.2016
Дата завершения проекта	31.06.2019
Прочие ограничения и допущения*	не имеются

* к прочим ограничениям можно отнести ограничения на количество ресурсов (н., ограничения по времени использования научного оборудования, времени работы участников проекта), ограничения, определяемые законодательством, связанные с охраной окружающей среды и т.д.

4.3 планирование управления научно - техническим проектом

Группа процессов планирования включает в себя процессы, необходимые для определения содержания работ, уточнения целей, а так же разработки последовательности необходимых для достижения поставленных целей действий.

4.3.1 Иерархическая структура работ проекта

Данный раздел содержит детализацию укрупнённой структуры выполняемых по проекту работ, в которой структурируется и определяется содержание всего исследования.

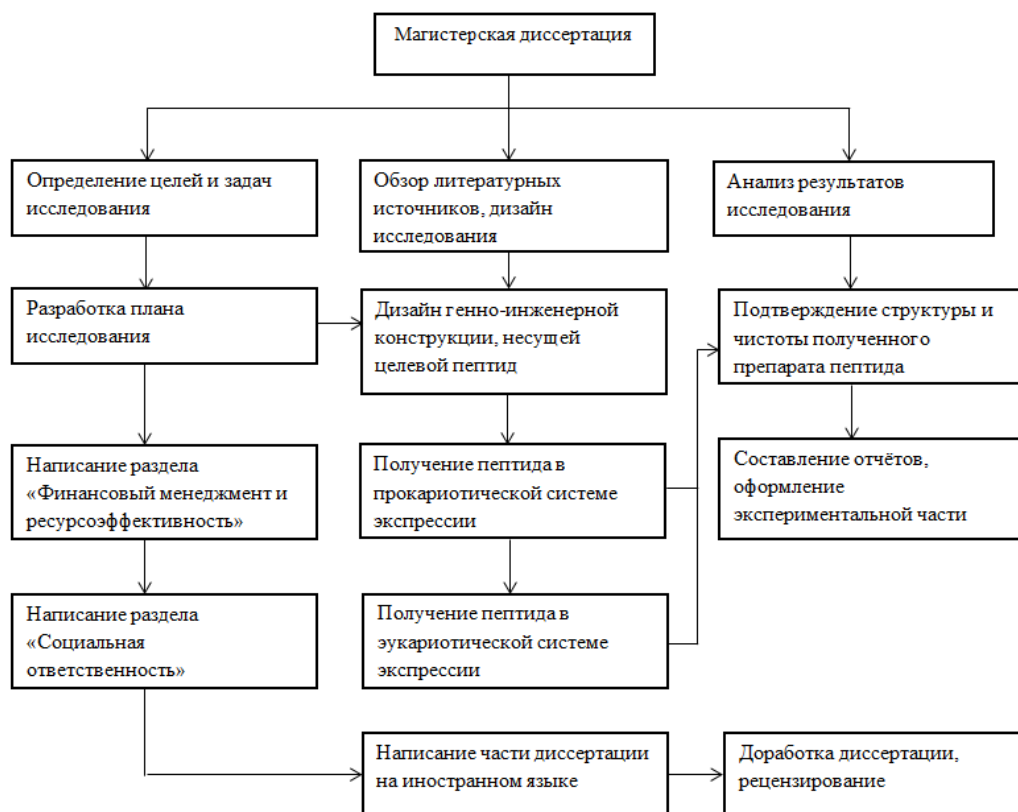


Рисунок 4.2 Иерархическая структура работ по проекту.

4.3.2 Контрольные события проекта

Определим ключевые события для периода проекта, соответствующего периоду обучения основного исполнителя по магистерской программе (сентябрь 2016 – июнь 2018), даты и результаты, которые должны быть получены по состоянию на эти даты.

Таблица 4.6 Контрольные события проекта.

Контрольное событие	Дата	Результат (подтверждающий документ)
Постановка целей и задач, разработка плана работ	10.10.16	План выполнения работ
Обзор литературных источников	20.12.16	Существующие методики, краткий литературный обзор
Определены оптимальные условия экспрессии целевого белка	25.04.17	Электрофореграммы подбора условий, данные денситометрии, спектрофотометри
Определены оптимальные условия выделения белка.	30.05.17	Электрофореграммы фракций очистки
Подобрана методика отделения пептида от белка-слияния	29.01.18	Электрофореграммы
Подобраны условия хроматографической очистки пептида	25.03.18	Хроматограммы, электрофореграммы
Написание магистерской диссертации	15.04.18-1.06.18	Магистерская диссертация

4.3.3 План проекта

Линейный график за период магистерской программы представлен в таблице 4.7.


Таблица 4.7 Календарный план проекта.

Название	Длительность, дни	Дата начала	Дата окончания	Состав участников
Определение целей и задач, разработка плана	7	15.10.16	1.11.16	Першина А.Г., Киржаева Л.С.
Обзор литературных источников, дизайн экспериментальной части	21	15.11.16	25.11.16	Киржаева Л.С..
Подбор температурных условий	28	3.10.16	17.11.16	Першина А.Г., Киржаева Л.С.
Оценка количества экспрессируемого белка «кетостероидизомераза-пептид»	70	17.11.16	26.12.2016	Киржаева Л.С.
Оптимизация методов выделения химерного белка «кетостероидизомераза-UBI18-35»	49	9.01.17	20.02.17	Киржаева Л.С.
Хроматографическая очистка химерного белка	14	20.02.17	6.03.17	Киржаева Л.С.
Анализ результатов, составление отчётов	28	6.03.17	10.04.17	Першина А.Г., Киржаева Л.С.
Написание диссертации	56	10.04.17	5.06.17	Киржаева Л.С..

Диаграмма Гантта — тип столбчатых диаграмм (гистограмм), который используется для иллюстрации календарного плана проекта, на котором работы по теме представляются протяжёнными во времени отрезками, характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ.

Вид работ	Исполнители	T _к , дни	сен	окт	ноя	дек	янв	фев	мар	апр	май	июн
Определение целей и задач, разработка плана	Руководитель, магистрант	7										
Обзор литературных источников, дизайн экспериментальной части	Магистрант	21										
Подбор температурных условий	Руководитель, магистрант	28										
Оценка количества экспрессируемого белка «кетостероидизомераза-пептид»	Магистрант	70										
Оптимизация методов выделения химерного белка «кетостероидизомераза –UBI ₁₈₋₃₅ »	Магистрант	49										
Хроматографическая очистка химерного белка	Магистрант	14										
Анализ результатов, составление отчётов	Руководитель, магистрант	28										
Написание диссертации	Магистрант	56										

Рисунок 4.3 Календарный план-график проведения проекта по теме «Диагностика септического воспаления с использованием антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅».

 работы, выполняемые магистрантом;

 работы, выполняемые руководителем.

4.4 Бюджет научного исследования

При планировании бюджета научного исследования необходимо обеспечить полное и достоверное отражение всех видов необходимых для его выполнения планируемых расходов.

4.4.1 Сырьё, материалы, покупные изделия и полуфабрикаты (за вычетом отходов)

Таблица 4.8 Материальные затраты на получение рекомбинантного пептида.

Наименование	Ед-ца измерения	Количество	Цена за ед-цу, руб.	Затраты на материалы, руб
LB-среда	кг	0,1	5774	577,4
N-N'-метилен-бис-акриламид	г	4	55	220
Ni-NTA-агароза	мл	3	846,65	2540
Акриламид	кг	0,1	170	17
Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид	г	5 г	4239	21195
Лизоцим	кг	10 г	29500	295
Кумасси G250	г	3	110	330
Кумасси R250	г	5	110	550
Мочевина	л	0,5	32,5	48,75
Итого				25848,1

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 таблице 4.9.

Таблица 4.9 Расчёт бюджета затрат на приобретение спецоборудования для научных работ.

Наименование оборудования	Кол-во ед-ц	Цена ед. оборуд-я	Общая стоимость	Срок службы, лет	Амортизационные отчисления за период работы
Вортекс Microspin FV-2400	1	12780	12780	10	213,43
Твердотельный настольный термостат БИС*	1	4300	4300	10	4300
Термостат-инкубатор с естественной конвекцией Binder	1	93340	93340	10	155,88
Спектрофотометр Unico	1	69000	69000	10	11152,3
Источник питания и камера для вертикального электрофореза BioRad Mini-PROTEAN	1	350000	350000	10	5845
Аналитические весы Ohaus Adventurer	1	68000	68000	10	1135,6
Лабораторная качалка с термостатом КТ 103*	1	12000	12000	10	12000
Ледогенератор PORKKA	1	70000	70000	10	1169
Центрифуга с охлаждением Sigma	1	36000	36000	10	601,2
Холодильник Бирюса*	1	15000	15000	10	15000
Холодильник низкотемпературный Sanyo	1	75000	75000	10	1252,5
Настольная центрифуга Eppendorf	1	56780	56780	10	948,23
Роторный шейкер Multi-Rotator*	1	15000	15000	10	15000
Система гель-документирования Synegen	1	180000	180000	10	300,6
Ультразвуковой гомогенизатор Bandelin Sonopuls HD 2070	1	172100	172100	10	2874,07
Магнитная мешалка Magnetic Stirrer MSH-300*	1	9500	9500	10	9500
Установка для лиофильной сушки FreeZone	1	418390	418390	10	6987,11
Ламинарный шкаф	1	310000	310000	10	5177
Итого		2083190	2083190		80371,34

* — оборудование не входит в основные фонды, вместо амортизационных отчислений учитывается полная стоимость.

Расчёт амортизационных отчислений осуществляется по формуле:

$$E_{\text{ам}} = \frac{\sum K_{\text{оби}} \cdot H_{\text{оби}} \cdot T_{\text{оби}}}{365 \cdot 100} \quad (4.2)$$

где $K_{\text{оби}}$ — стоимость ед. прибора или оборудования, руб.;

$H_{\text{ами}}$ — норма амортизации прибора или оборудования, %;

$T_{\text{оби}}$ — время использования оборудования, дни.

4.4.3 Основная заработная плата

В настоящую статью включается основная заработная плата работников, непосредственно участвующих в исследовании, включая премии, доплаты и дополнительную заработную плату. Величину расходов по данной статье определяют с учётом трудоёмкости выполняемых работ и действующей системы оплаты труда.

Таблица 4.10 Основная заработная плата исполнителей темы

Исполнитель и	Исполнитель и по категориям	Трудоёмкость, чел.-дн	Зар.плата, приходящаяся на один чел.-дн., тыс. руб.	Всего заработная плата по тарифу (окладам), руб.
Магистрант		273	0,098	27000
Руководитель	к.б.н., доцент	68	2,165	147220
По экономике	доцент, к.н.	7,5	1,821	13657,5
По охране труда	доцент, к.т.н.	7,5	1,821	13657,5
По ин.яз	доцент, д.ф.н.	7,5	1,821	13657,5
Итого				211597,5

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

$$Z_{\text{осн}} = Z_{\text{дн}} \cdot T_{\text{р}} \quad (4.3)$$

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

$T_{\text{р}}$ — продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн.;

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

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{\text{дн}} = \frac{Z_{\text{м}} \cdot M}{F_{\text{д}}} \quad (4.4)$$

где $Z_{\text{м}}$ – 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;

$F_{\text{д}}$ — действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб. дн.

Таблица 4.11 Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Консультанты
Календарное число дней	365	365
Количество нерабочих дней		
- выходные дни	52	46
- праздничные дни	14	12
Потери рабочего времени		
- отпуск	48	48
- невыходы по болезни	0	0
Действительный годовой фонд рабочего времени	251	251

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_{\text{м}} = Z_{\text{тс}} \cdot (1 + k_{\text{пр}} + k_{\text{д}}) \cdot k_{\text{р}} \quad (4.5)$$

где $Z_{\text{тс}}$ – заработная плата по тарифной ставке, руб.; $k_{\text{пр}}$ – премиальный коэффициент, равный 0,3 (т.е. 30% от $Z_{\text{тс}}$); $k_{\text{д}}$ – коэффициент доплат и надбавок составляет примерно 0,2; $k_{\text{р}}$ – районный коэффициент, равный 1,3 (для Томска).

Результаты расчёта фонда заработной платы производственных рабочих вносятся в таблицу 12.

Таблица 4.12 Расчёт фонда заработной платы

Исполнители	Категория	$Z_{гс}$, руб.	$k_{пр}$	$k_{д}$	$k_{р}$	$Z_{м}$, руб.	$Z_{дн}$, руб.	$T_{р}$, раб. дн.	$Z_{осн}$, руб.
Магистрант		2250	0,3	0,2	1,3	4563	0,098	273	27000
Руководитель	к.б.н, с.н.с.	24903,8	0,3	0,2	1,3	48562,5	2165	68	147220
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 англ. языку	доцент, к.ф.н	23256,4	0,3	0,2	1,3	45350	1821	7,5	13657,5
Итого									215181

4.4.4 Дополнительная заработная плата научно-производственного персонала

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:

$$Z_{\text{доп}} = k_{\text{доп}} \cdot Z_{\text{осн}} \quad (4.6)$$

$$Z_{\text{доп.магистранта}} = 0,12 \cdot 27000 = 3240 \text{ руб}$$

$$Z_{\text{доп.руководителя}} = 0,12 \cdot 147220 = 17666,4 \text{ руб}$$

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

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

4.4.5 Отчисления на социальные нужды

Величина отчислений во внебюджетные фонды определяется следующей формулой:

$$Z_{\text{внеб}} = k_{\text{внеб}} \cdot (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}), \quad (4.7)$$

где $k_{\text{внеб}}$ – коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды (пенсионный, фонд обязательного медицинского страхования и т.д.). Принимается равным 0,271. Величина отчислений составила

На 2015 г. в соответствии с Федеральным законом от 24.07.2009 №212-ФЗ установлен размер страховых взносов равный 30%. На основании пункта 1 ст.58 закона №212-ФЗ для учреждений, осуществляющих образовательную и научную деятельность, в 2014 году была введена пониженная ставка – 27,1%.

4.4.6 Научные и производственные командировки

В эту статью включены расходы по командировкам научного и производственного персонала, связанного с непосредственным выполнением конкретного проекта, величина которых принимается в размере 10% от основной и дополнительной заработной платы всего персонала, занятого на выполнении данной темы.

Затраты на командировки составили 21159,75 руб.

4.4.7 Накладные расходы

К накладным расходам относятся затраты на управление и хозяйственное обслуживание, а так же расходы по содержанию, эксплуатации и ремонту оборудования, производственного инструмента и инвентаря, зданий, сооружений и др.

$$C_{\text{накл}} = k_{\text{накл}} * (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}), \quad (4.8)$$

где $k_{\text{накл}}$ – коэффициент накладных расходов.

Коэффициент накладных расходов принимается равным 0,9

$$C_{\text{накл}} = 0,9 * (215181 + 22545,3) = 213953,67 \text{ руб.}$$

Таблица 4.13 Бюджет научного исследования

Наименование статьи	Сумма, руб.
1. Материальные затраты НТИ	75000
2. Затраты на специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ	2083190
3. Затраты по основной заработной плате исполнителей темы	215191
4. Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы	22545,3
5. Отчисления во внебюджетные фонды	63335,8
6. Затраты на научные и производственные командировки	21159,75
8. Накладные расходы	213953,67
Итого:	2787875,52

4.5 Организационная структура проекта

В практике используется несколько базовых вариантов организационных структур: функциональная, проектная, матричная. Поскольку степень неопределённости условий реализации текущего проекта и его сложность являются высокими и в связи с новизной предлагаемой технологии данное исследование имеет проектную организационную структуру.



Рисунок 4.4 Проектная структура проекта «Получение рекомбинантного антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅».

4.6 Матрица ответственности

Для распределения ответственности между участниками проекта формируется матрица ответственности (таблица 4.14)

Таблица 4.14 Матрица ответственности.

Этапы проекта	Руководитель	Исполнитель-магистрант	Внешний исполнитель – масс-спектрометрия	Внешний специалист – хроматография	Консультант Финансовый менеджмент	Консультант Социальная ответственность	Консультант Английский язык
Обзор литературных источников, дизайн экспериментальной части	У, С	И					
Дизайн исследования определен	У	И					
Получение пептида UBI ₁₈₋₃₅ в прокариотической системе экспрессии	У	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

Степень участия в проекте может характеризоваться следующим образом:

- *Ответственный (О)* — лицо, отвечающее за реализацию этапа проекта и контролирующее его ход;
- *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

План управления коммуникациями отражает требования к коммуникациям со стороны участников проекта. Фрагмент плана приведён в таблице 4.15.

Таблица 4.15 План управления коммуникациями проекта «Получение рекомбинантного антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅».

Какая информация передаётся	Кто передаёт информацию	Кому передаётся информация	Когда передаётся информация
Дизайн исследования	Исполнитель-магистрант	Руководителю	В течение месяца после начала проекта
Обмен информацией о текущем состоянии проекта	Исполнитель-магистрант	Руководителю	Еженедельно (пятница)
Данные по анализу структуры полученного продукта	Внешний исполнитель — спектрометрия	Руководителю, исполнителю-магистранту	В течение 3-х дней после выполнения задачи
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	Исполнитель-магистрант	Консультант Финансовый менеджмент	Не позже двух недель до завершающей вехи по проекту

4.8 Реестр рисков проекта

Идентифицированные риски проекта включают в себя возможные неопределённые события, которые могут возникнуть в проекте и привести к нежелательным последствиям.

Таблица 4.16 Реестр возможных рисков проекта.

Риск	Потенциальное воздействие	Вероятность наступления (1-5)	Влияние риска (1-5)	Уровень риска	Способы смягчения риска
Низкий выход целевого продукта	Удорожание проекта, повышение трудоёмкости	3	5	высокий	Оптимизация условий экспрессии целевого продукта

Продолжение таблицы 4.16

Загрязнение пептида присутствующими в клетке белками	Снижение эффективности диагностического препарата	3	5	средний	Подбор оптимальных условий очистки
Отсутствие финансовой поддержки следующего этапа работ	Невозможность выполнения отдельных работ	3	4	средний	Тщательное планирование бюджета исследования

4.9 Оценка сравнительной эффективности исследования

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

Интегральный показатель финансовой эффективности научного исследования получают в ходе оценки бюджета затрат трёх (или более) вариантов исполнения научного исследования. Для этого наибольший интегральный показатель реализации технической задачи принимается за базу расчёта (как знаменатель), с которым соотносятся финансовые значения по всем вариантам исполнения.

Интегральный финансовый показатель разработки определяется по формуле:

$$I_{\Phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{max}}, \quad (4.9)$$

где I_{Φ}^p – интегральный финансовый показатель разработки; Φ_{pi} – стоимость i -варианта исполнения; Φ_{max} – максимальная стоимость исполнения научно-исследовательского проекта (в т. ч. аналогов).

Таблица 4.17 Сравнение интегральных показателей разработки.

Вариант выполнения	Бюджет затрат НИИ, руб	Интегральный финансовый показатель разработки
1 – предлагаемая технология	2 787 875,52	0,19
2 – химический синтез	10 884 749	0,74
3 – выделение из природного сырья	14 694 411 (max)	1

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).

Интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов исполнения объекта исследования можно определить следующим образом:

$$I_m^a = \sum_{i=1}^n a_i b_i^a, I_m^p = \sum_{i=1}^n a_i b_i^p, \quad (4.10)$$

где I_m – интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов; a_i – весовой коэффициент i -го параметра; b_i^a , b_i^p – бальная оценка i -го параметра для аналога и разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания; n – число параметров сравнения.

Таблица 4.18 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. Надёжность	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:

$$I_{\text{финр}}^P = \frac{I_m^P}{I_\phi^P} \quad (4.11)$$

$$I_{\text{финр}}^a = \frac{I_m^a}{I_\phi^a} \quad (4.12)$$

$$I_{\text{финр}}^P = \frac{3,9}{0,19} = 20,53;$$

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

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

$$\mathcal{E}_{cp} = \frac{I_{финр}^p}{I_{финр}^a}; \quad (4.13)$$

$$\mathcal{E}_{cp} = \frac{20,53}{3,04} = 3,47.$$

Таблица 4.19 Сравнительная эффективность разработки.

№п/п	Показатели	Аналог	Разработка
1	Интегральный финансовый показатель разработки	0,74	0,19
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки	2,25	3,9
3	Интегральный показатель эффективности	3,04	20,53
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	6,75	

Сравнение значений интегральных показателей эффективности позволяет установить намного более высокую эффективность проектируемой разработки по сравнению с существующими аналогами с позиции финансовой и ресурсной эффективности.

Вывод: в результате проведения исследования по разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение» определили показатели затрат научно-исследовательской работы. Бюджет затрат НИИ равный 2787875,52 рублей. Основная часть которого приходится на приобретение оборудования и на зарплаты сотрудников.

**Приложение
Приложение А
Часть ВКР на английском языке**

Раздел 1

Обзор литературы

Студент:	ФИО	Подпись	Дата
Группа			
4ДМ61	Киржаева Любовь Сергеевна		

Консультант – лингвист отделения иностранных языков Школы БИП:	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Должность				
Старший преподаватель	Кобзева Надежда Александровна	доцент		

1 Literature review

1.1 Diagnosis of purulent infections

The problem of diagnosis and therapy of purulent infections has been essential throughout the time. Infection will stay an important problem of surgery in the past, present and future. [8]. Surgical infection takes about 30-50% in total statistics of surgical diseases. This is due to a significant number of primary purulent-inflammatory deterioration after operations, wounds, injuries. This is confirmed by the structure of surgical diseases studied by V. I. Struchkov.:

- 1) infection causing inflammatory processes --- 35-40%;
- 2) injury damaging organs ----- 15-20%;
- 3) tumors ----- 15-17%;
- 4) circulatory disorders that cause gangrene --- 4-10%;
- 5) defects requiring correction ----- 3-5%;
- 6) metabolic disorders ----- 3-4%;
- 7) other pathological processes ----- 4-6%.

Despite using of new and strong antibacterial agents, the number of post-traumatic, postoperative, post-wound infectious deteriorations does not go to decrease, but remains practically at the level of the pre-antibiotic period, containing about 35%. In addition, the causes of 43% of deaths after their operations are purulent complications [8].

The number of purulent diseases in surgery does not decrease, and the problem of surgical infection takes an important position in a row of clinical and research tasks facing modern healthcare.

Despite the rapid development and improvement of the technical base, the problem of timely diagnosis of surgical purulent infection remains not completely resolved. Diagnosis based only on the evaluation of the clinical presentation is unsatisfactory correct, that is not permissible at the present stage of the development of surgery [9].

Diagnostic mistakes lead to the implementation of insufficient radical operations or untimely surgical treatment that can lead to an increase in the extent of the lesion, the development of sepsis and other complications. [34]

Osteomyelitis is still one of the most frequent diseases to date that stands out among others purulent inflammatory processes by the severity of the disease that makes early diagnosis more difficult and it is the cause of high frequency of adverse treatment outcomes, complications [9].

Osteomyelitis as a nosological form includes purulent inflammation of the bone marrow (osteomyelitis), compact and short bone (ostitis), and periosteum (periostitis). According to the etiology, nonspecific osteomyelitis caused by microbes - saprophytes, and specific osteomyelitis of tuberculosis, scarlet fever, syphilitic paratyphoid and other genesis [10].

If the disease pathogens penetrate inside of the bone from the blood vessels it shows a hematogenous form of osteomyelitis. The exogenous microbial contamination occurs in non-hematogenous form. Posttraumatic, postoperative and post-injection osteomyelitis may occur, respectively, with open fractures of the bone, after operations, blockades, injections.

Another mechanism of bone damage is the spread of infection on it from nearby infected tissues with phlegmon, purulent swelling. In non-specific hematogenous and post-traumatic osteomyelitis in the last stages of the disease, the differences are becoming smaller. [9,10].

The transition of acute osteomyelitis to chronic can be found in 10-45% of patients, with further relapses even after heart operations. Chronic osteomyelitis is a widespread disease that covers up to 10% of all fixed patients with purulent pathology and takes up to 8% in the structure of the pathology of the musculoskeletal system. In the genesis of osteomyelitis there is an advantage of mechanical trauma, including iatrogenic [11].

Despite the achievements of traumatology in recent decades, the frequency of infection of fractures, especially open and the development of osteomyelitis does not tend to decrease. During the past 10 years the level of injuries in our

country has been constantly increasing. Every year, over 13 million people (about 10% of the population) are injured in the Russian Federation. There is an increasing proportions of severe injury, multiple combined injuries involving in the appearance of a set of symptoms of traumatic disease [12].

Applied to the occurrence of posttraumatic osteomyelitis, we consider it appropriate to mention the expression of IV. Davydovsky [10]: "The entry of microbes into the wound is a regularity, and the development of infection in the wound is an event during the wound process."

Infection of a fracture and even suppuration of a bone wound is not always an "event", personifying osteomyelitis. Purulent processes in dense bone tissue develops more often against the background of reducing the overall reactivity, homeostasis disorders, immunosuppression of the macroorganism, i.e. when microbes get on fertile soil, "loosened" traumatic disease [35].

For early diagnosis of osteomyelitis used methods such as: ultrasound, puncture of the bone, thermography, osteostalemate. These methods allow to detect the strengthening of the contours of the soft tissues, the reaction of the periosteum in the form of a "periosteal visor" and the focus of bone destruction. For early diagnosis and differential diagnosis with other diseases are highly informative computer and magnetic resonance imaging [13].

Also for the diagnosis of osteomyelitis used x-ray methods, reflecting the structural changes of bone tissue in the area of the lesion. The use of osteoscintigraphy is limited to early recognition of acute hematogenous osteomyelitis, indirect determination of the intensity of the inflammatory process and differential diagnosis of osteomyelitis with other diseases. Possessing high sensitivity, this diagnostic method allows assessing functional changes in bone tissue before the appearance of structural transformations [13, 14].

A lot of different instrumental and laboratory methods of investigation have been proposed to increase the effectiveness of diagnosis of purulent surgical infection. One of such method is the use of antimicrobial peptides for the diagnosis of septic inflammation [32].

1.2 Antimicrobial peptides

Currently, peptides (molecules of protein nature ranging in size from 3 to 50 a.c.) are widely used for diagnostic purposes. They provide highly specific binding to target cells, but are smaller in size than proteins and have low immunogenicity. Thus, peptides are promising objects of modern molecular medicine [15].

Antimicrobial peptides are hydrophobic, positively charged molecules, consisting of 8-20 amino acid residues. Their antimicrobial activity is based on the interaction of a cationic (positively charged) domain with a negatively charged surface of a microorganism carrying negatively charged phospholipids, lipopolysaccharides, teichoic acids [16]. This ensures the targeted accumulation of peptides in the foci of microbial infection [6].

The existence of AMP has been known for several decades, but only recently has interest in these molecules shifted from the field of basic research of the immune system to the clinical area. For present three families of such peptides have been found in humans: defensins, cathelicides, and histatin. All of them are produced and function as part of the body's immune defense [35].

The key advantage of antimicrobial peptides is their high specificity and ability to bind only to live bacteria [17]. Due to the ability of peptides to be embedded in the membrane of the microbial cell, a highly selective accumulation of peptides in the focus of purulent inflammation is achieved, while the accumulation in sterile inflammation does not occur [18].

The first antimicrobial peptide ubiquitin (UBI) belonging to the class of defensins, was isolated from mouse macrophages, later, an identical peptide was detected in the epithelial cells of the respiratory tract. It was previously shown that antimicrobial peptides-ubiquitin (UBI) fragments labeled with radionuclides exhibit high specificity to bacterial and fungal infection, and detection sensitivity reaches about 10⁴ microbial cells [35]. These peptides do not accumulate in the foci of sterile inflammation induced by lipopolysaccharides (LPS), terpentine oil or dead microorganisms [19].

Currently, there are several classifications of antibiotics, so that the classification of an antibiotic to a particular class is some difficulty. This problem exists in the field of biomedical science, working in AMP, resulting in AMP sometimes include such antibiotics as bacterial polypeptides, composed of thio amino acids, in particular lanthionine and metallothionein and/or residues of fatty acids[20].

Generally antimicrobial peptides are low selectivity; they are toxic to both bacteria and eukaryotic cells (such as magainin and indolicidin) [20]. At the same time, some AMP (in particular, pseudins) do not have a hemolytic effect in concentrations demonstrating an antimicrobial effect.

Understanding the mechanisms of antimicrobial peptide recognition of pathogens is a necessary condition for the creation of drugs a drug based on said compounds. The most important factor determining the selectivity of AMP is the difference in the composition of membranes of bacterial and eukaryotic cells. The outer surface of eukaryotic cell membranes consists of zwitterionic phospholipids, while bacterial cell membranes contain a large number of negatively charged phospholipids both on the inner and outer surface of the lipid bilayer[21].

The acidic nature of the outer side of the prokaryotic membranes causes its interaction with predominantly positively charged AMP. The second factor causing the selectivity of AMP is the absence of cholesterol in the membranes of bacterial cells. As a result, the lipid bilayer of bacterial membranes is more fluid, and the formation of pores with antimicrobial peptides in it is easier than in eukaryotic cell membranes[20,21 In addition, the large negative transmembrane potential on the internal membrane of bacterial cells also contributes to the formation of pores under the action of AMP.

Antimicrobial peptides, as a rule, are amphiphilic compounds with a pronounced hydrophilic and hydrophobic part. With rare exceptions, AMP molecules contain several lysine and / or arginine residues and carry a positive charge at physiological pH values [36]. The structure of AMP can be divided into two large groups, namely cyclic peptides that structure is usually supported by -S-S

bonds and linear peptides. The linear peptides can be divided into "typical" peptides forming an α -helical secondary structure, and linear peptides having an atypical secondary structure.

The latter are enriched with the residues of Pro, Arg or Trp usually [22]. In this case, most peptides have in their sequence domains with different secondary structure. Therefore, when a peptide include, for example, α -helical AMP, means that its sequence is dominated by α -helical domains. "Typical" linear peptides can be found in the lipid bilayer both in the form of α -helix and in the form of β -layers. Both β -folded and α -helical structures exhibit amphiphilic properties, and the hydrophobic and hydrophilic regions are located on opposite sides of the core.

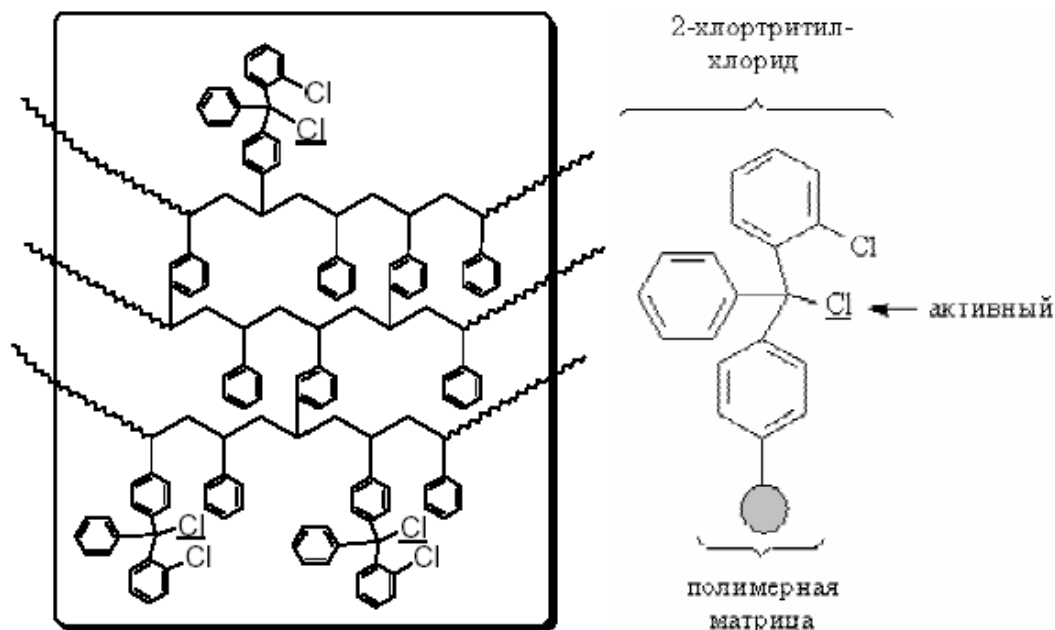
The amphiphilic nature of AMP promotes interaction with membranes that the polar regions of the peptide interact with the polar "head" of the phospholipid and the hydrophobic regions of the peptide interact with the fatty acid residues of the membrane by hydrophobic interactions. [22]

1.3 Solid phase peptide synthesis

Solid phase synthesis of peptides was discovered by R. B. Merrifield from the Rockefeller University, who received the Nobel Prize for this discovery in 1984. This method is based on fixing the peptide on an insoluble polymer substrate with sequential attachment of amino acid residues with protected α -amino and side groups [23]. The polymer resin based on 2-chlorotriptyl chloride, which was first proposed by K. Barlos, is unstable to the action of acids.

The spatial structure of the polymer resin, as well as the moderate acidity required to break the bonds in the chains, make the resin useful for many applications. For N- α -amino acid protection use an Fmoc group that is unstable to base action is used. After removing this protective group, the next protected amino acid is added with using either a binding reagent or a pre-activated protected amino acid derivative. The final peptide is attached to the polymer matrix via its C-terminal group, the bond to the polymer being cleavable to yield a peptidic acid or amide (depending on the binding reagent used). To protect the side chains often

choose such groups, the splitting of which takes place simultaneously with the separation of the peptide from the polymer matrix [24].



Picture 1.1. 2-Chlorotriyl chloride, attached to the polymer carrier - polystyrene, cross-linked with 1% divinylbenzene [24].

To obtain the synthetic peptide UBI18-35, solid phase synthesis is currently widely used [25]. Solid-phase synthesis begins with the binding of the carboxyl group of the peptide's protected amino acid to the corresponding resin, usually through an ester or amide bond. Protect groups of side chains of amino acids by means of various chemical reagents.

This is followed by repeated cycles of building amino acid sequence, including: the release of the amino group of the intermediate-formed N-terminal-protected peptide resin, activation of the carboxyl group of the following NH₂-protected amino acid, the combination of amino acids with the formation of a peptide bond. As a combining reagent, various activated reagents used in the synthesis of peptides, for example, carbodiimides [26], are used. The activated amino acid derivative is usually used in 1.5-4 times excess.

In cases an incomplete combination occurs the reaction is repeated. After obtaining a full-size peptide sequence, the final release, removal of protection from the side groups of amino acids and the cleavage of the finished peptide from the resin, for example, using trifluoroacetic acid [30].

Peptide synthesis is widely used for structural and functional studies to obtain analogues of biologically active peptides, including cyclic derivatives with predetermined properties (for example, with prolonged, enhanced or selective action), also analogues with non-protein amino acid residues, for studying the antigenic properties of fragments proteins, and the production of site-specific polypeptide chains of antibodies used in structural-functional analysis and in the development of diagnostic systems and vaccines [27].

However, obtaining the necessary amount of peptide, especially hydrophobic and / or with a long sequence of more than 15 a.c. the method of solid-phase synthesis has a number of limitations [28], namely: the occurrence of erroneous sequences, the omission of amino acids due to incompleteness of the stages of release and amino formation; self-Association of peptide chains due to the formation of hydrogen bonds, causing shielding of the N-terminal amino group; and high cost of synthesis. An additional negative factor in chemical synthesis is the use of toxic solvents and reagents in work [29].

The limitations of the solid-phase synthesis method for the production of peptides is its high cost and toxicity of the reagents used, as well as the contamination of the target product by the products of side reactions and the complexity of the purification of the target peptide due to the fact that the by-products have a similar nature.

More profitable from an economic point of view is the genetic engineering method for producing peptides. However, it is important to note that the recombinant technology for the production of antimicrobial peptides requires a careful selection of the vector, the strain-producer, as well as the optimization of the expression and purification conditions of the target peptide [28].

1.4 Review of methods for purifying proteins and peptides.

Optimization of the protein or peptide purification method is primarily aimed at obtaining a product with a high frequency provided that the cost of the purification procedure is minimized. In this connection, the use of relatively simple clean-up techniques often achieves the desired result [31].

Most often when working with proteins, peptides, the following techniques are used:

Concentration. Concentration is carried out by precipitating the protein from the diluted solution and dissolving the resulting precipitate into a smaller volume. The most commonly used are acetone or ammonium sulfate. The concentration of protein in the initial solution should be at least 1 mg/ml. Also used the adsorption of proteins from very dilute solutions using ion-exchanger elwira later small volumes of saline solutions. To speed up the procedure of concentration of protein solutions, such water-removing agents as dry gel-filtering carrier (Sephadex), highly substituted carboxymethyl cellulose or polyethylene glycol (PEG) [37]. The sample is placed in a dialysis bag, which is immersed in a powder that absorbs water. The most effective approach to protein concentration is ultrafiltration, based on the use of semipermeable membranes with certain pore sizes that prevent the protein from leaving the membrane.

Dialysis.

During dialysis, substances of molecular weight less than the pore size of the dialysis membrane are removed from the protein solution .

Most often used for dialysis cellophane membrane. On sale are dialysis tubes of various diameters, with a pore size from 500 to 100000 And more. For more effective removal of low molecular weight substances during dialysis, frequent change of buffer solution in dialysate is necessary. Dialysis is a long procedure, usually it is put on at night. Depending on the protein solution, dialysis may last several days and during this time a change of buffer solution is required [38].

Thermal denaturation. At the initial stage of purification heat treatment is rarely used to separate proteins. It is effective when the protein is relatively stable under heating conditions, while other proteins denature. This changes the pH of the solution, the temperature and the processing time. A series of several small experiments is preliminarily carried out for selecting suitable conditions.

The proteins are far from a homogeneous state after the first stages of purification. In the resulting mixture proteins differ from each other by molecular weight, stability, solubility, the total charge of the molecule, etc. These differences can be the basis for further protein separation methods [39]. Protein purification is a multi-step process and at each stage we get a fraction richer in the released protein than at the initial stage. Often this process is called fractionation.

The precipitation of proteins by organic solvents.

This method is one of the oldest methods and plays an important role in the purification of proteins on an industrial scale. The most common solvents are methanol, dioxane, acetone and ethanol, rarely used – isopropanol. The essence of the method is to reduce the ability of water to solvation of charged hydrophilic protein molecules as the concentration of organic solvent increases. There is a decrease in protein solubility and, as a consequence, aggregation and deposition. One of the most important criteria affecting deposition is the size of the protein molecule[38.39]. The size of the protein molecule is inversely proportional to the concentration of the organic solvent causing the protein to precipitate.

Using solvent must have a good precipitating effect, be completely mixed with water and not react with proteins. One of the advantages of the method of fractionation with organic solvents is that it can be carried out at a temperature below zero, since all the solvents mixed with water form mixtures that freeze at a temperature much lower than 0 ° C. This is a very important property, since it is necessary to maintain a low temperature during fractionation [40].

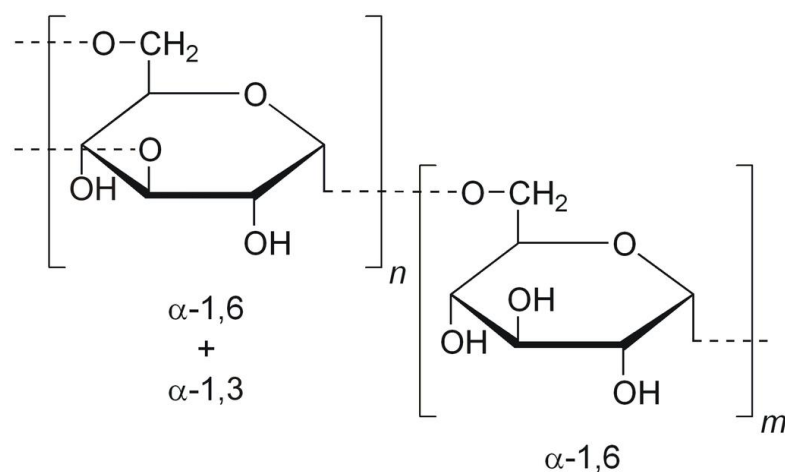
The most commonly used for the precipitation of proteins is acetone. It has a less denaturing effect than ethanol because at subzero temperatures, its concentrations are slightly lower, in order to obtain the same precipitation as when

using ethanol. It is also more volatile, that makes it easy to remove it from the dissolved sediment under reduced pressure.

The deposition procedure is as follows: the sample is usually cooled to 0 °C. in an ice-cold bath. The protein concentration can be 5-30 mg / ml, and the salt concentration should not be high. A high concentration of salt reduces electrostatic aggregation, and higher concentrations of the solvent are required, which increases the probability of denaturation. At a low concentration of salt, a thin slurry can form, which is difficult to precipitate. The optimum salt concentration is 0.05-0.2 M. The solvent is added slowly to avoid heating. Most proteins are precipitated by the addition of 20-50% solvent (by volume) [41]. After equilibration of the mixture for 10-15 minutes, the precipitate is separated by centrifugation. The precipitate is then dissolved in cold buffer. Typically, the buffer volume is 2 times the volume of the precipitate. Small amounts of organic solvent (about 10% by volume) do not interfere with further fractionation. If the temperature during fractionation with organic solvents is high, protein denaturation occurs. However, some enzymes are highly stable, and denaturation is selective [39,41].

Gel filtration.

Using the method of gel filtration, macromolecules can be quickly separated according to their size. The carrier for chromatography is a gel which consists of a cross-linked three-dimensional molecular network formed in the form of beads (granules) for the convenience of filling columns. Sephadexes are cross-linked dextrans (α-1,6-glucans of microbial origin) with given pore sizes. The chains of dextran are crosslinked by three-carbon bridges with epichlorohydrin [41].



Picture 1.2 The structure of dextran [41]

The less of cross-links the more the dimensions of the holes. The gel obtained in this way plays the role of a molecular sieve. When the solution of the mixture is passed through a column filled with swollen Sephadex granules, large particles whose size exceeds the pore size of Sephadex will move quickly. Small molecules, such as salt, will move slowly as they penetrate into the granules. The column filled with Sephadex is characterized by the total volume V_0 , which consists of the internal volume V_B , located inside the granules, the volume of the external V_N , occupying the space between the granules, and the volume V_M , reflecting the mass of the gel, and can be calculated by the formula (1). The distribution of matter between the internal and external volumes is characterized by the coefficient of distribution of Raman, determined by the formula (2):

$$K_p = \frac{V_e - V_H}{V_b} \quad (2)$$

$$V_b$$

If the substance does not penetrate the globules, the volume of elution is equal to the outer volume and $K_p = 0$. If the substance is evenly distributed within the granules and between them, the volume of elution is the sum of the internal and external volumes and $K_p = 1$. There are various Sephadex grades, differing in pore size, denoted as G-10, 15, 25, 50, 75, etc. The smaller the number, the greater the number of cross-links the molecule contains, the less water absorbs the granule when swelling. The pores of the granules grow with the growth of the Sephadex

brand number and increase the boundaries of the molecular weight of substances that can penetrate into the granules, and, consequently, capable of separation. Each Sephadex brand is produced with different particle sizes: ultra-thin, thin, medium and coarse. As a rule, the analytical work uses ultra - thin and thin, and in the preparative-medium and coarse [42].

In addition to sephadexes for gelfiltration of proteins using copolymers of acrylamide with bisacrylamide, called biogels (P-2, P-4, P-6, etc.), and sepharose – cross-linked agarose (agarose - a neutral component of agar). They all divide proteins according to molecular size, as Sephadex.

The main problem touches with using of Sephadex and polyacrylamide is the softness of their granules. Even the very low pressure in the column during chromatography causes deformation of the granules. These deficiencies are deprived of sephacryl – dextrans containing additional crosslinking formed by bisacrylamide. This new product from Amersham Bioscience displaces even the toughest cross-linked agaroses, such as CL-sepharose [39,42].

The most important recommendations: the column size should be 30-100 times larger than the volume of the sample, the protein concentration in the sample should be 10-20 mg/ml, the column length should be 20-40 times greater than its diameter.

Table 1.1 Some of the most common sorbents for gel filtration and their applications.

Brand name of gel, machinery manufacturer	Type of gel	Area parameters of separation by the property of the relative molecular mass
Sephadex G-10*	Dextran	-700
<i>Amersham Bioscience</i> G-15	«	-1 500
G-25	«	1 000-5 000
G-50	«	1 500-30 000
G-75	«	3 000-70 000
G-100	«	4 000-150 000

Table continuation 1.1

G-150	«	5 000-400 000
G-200	«	5 000-800 000
Bio-gels P-2	Polyacrylamide	200-2 6000
<i>Bio-Rad</i> P-4	«	500-4 000
P-6	«	1 000-5 000
P-10	«	5 000-17 000
P-30	«	20 000-50 000
P-60	«	30 000-70 000
P-100	«	40 000-100 000
P-150	«	50 000-150 000
6B Sepharose	Agarose	$-2 \cdot 10^6$
<i>Amersham Bioscience</i> 4B	«	$300\ 000-20 \cdot 10^6$
2B	«	$2 \cdot 10^6-25 \cdot 10^6$
CL-6B	The transverse-	$10\ 000-4 \cdot 10^6$
CL-4B	sewn	$60\ 000-20 \cdot 10^6$
CL-2B	agarose	$70\ 000-40 \cdot 10^6$
Sefarculars S-300	Dextran /bis	10 000-800 000
<i>Amersham Bioscience</i> S-400	acrylamide	$20\ 000-2 \cdot 10^6$

Gelfiltration is often used to remove salts from the protein solution and replace the buffer. Selection of conditions is carried out for each protein individually (table 2).

Table 1.2 Parameters of columns with Sephadex G-25, G-10 for desalting protein solutions.

Column Dimensions	Media Type	Column volume, cm ³	Sample volume, cm ³	Flow rate, ml • h ⁻¹	Time mechanisms of the process, min
1×8	Thin	8	1-1,5	40	7
6×10	Average	60	2-10	200	15
8×30	Average	240	10-30	250	30
8×60	Average	480	30-80	250	45
16×90	Rude	1440	80-300	500	90