

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-108

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА АНАЛЬГЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА*

STUDY OF THE GENETIC STABILITY OF THE ANALGESIC PEPTIDE PRODUCER STRAIN

А. П. Павленко^{1,2}, А. Н. Кветкина², Е. В. Лейченко^{1,2}¹Передовая инженерная школа Дальневосточного федерального университета, Владивосток²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, ВладивостокA. P. Pavlenko^{1,2}, A. N. Kvetkina², E. V. Leychenko^{1,2}¹Advanced Engineering School, Far Eastern Federal University, Vladivostok²G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, Vladivostok

✉ apavlenko141@gmail.com

Аннотация

Разработка новых, более эффективных, обезболивающих препаратов, обладающих высоким сродством к биологическим мишеням, является актуальной задачей. Кандидатом для разработки нового анальгетического препарата стал пептид морской анемоны *Heteractis magnifica* HCRG21, блокатор TRPV1-канала. В рамках работы были проведено исследование генетической стабильности штамма-продуцента гибридного белка SMT3_HCRG21.

Abstract

The development of new, more effective painkillers with high affinity for biological targets is an urgent task. A promising candidate for a new analgesic drug is the peptide HCRG21, a TRPV1 channel blocker from the sea anemone *Heteractis magnifica*. In this work, the genetic stability of the strain producing the SMT3_HCRG21 hybrid protein was studied.

Одной из важнейших прикладных задач современной биотехнологии является разработка эффективных способов получения ценных биологически активных соединений. Биотехнологические методы позволяют как получать вещества в лабораторных условиях — для изучения их свойств и выявления кандидатов в лекарственные средства, — так и масштабировать процесс для получения биологически активных соединений в количествах, достаточных для проведения клинических испытаний и производства активных фармацевтических субстанций.

В настоящее время актуальной задачей является разработка обезболивающих препаратов, так как арсенал современных анальгетиков ограничен опиоидами, нестероидными противовоспалительными средствами и аналогами ГАМК, которые либо недостаточно эффективны, либо обладают серьезными побочными эффектами. Кандидатом для разработки нового обезболивающего препарата стал пептид HCRG21, обнаруженный нами ранее в морской анемоне *Heteractis magnifica*. Было показано, что HCRG21 проявляет анальгетическую активность и является блокатором TRPV1-канала [1–4]. Известно, что антагонисты TRPV1 предотвращают боль, блокируя рецепторы на чувствительных нейронах и вызывая тем самым длительную анальгезию, что делает их реальной альтернативой традиционным анальгетикам [5]. Вещества пептидной природы обладают рядом преимуществ, таких как низкая иммуногенность и высокое сродство к биологическим мишеням. Более того, благодаря развитию генно-инженерных методов стало возможно получать пептидные препараты путем гетерологичной экспрессии.

Важными биотехнологическими этапами при производстве лекарственного препарата являются создание штамма-продуцента, определение его генетической стабильности и наработка экспериментального образца. Часто используемым организмом-хозяином для проведения гетерологичной экспрессии пептидов выступает *Escherichia coli* благодаря низкой стоимости, высокому уровню экспрессии и простоте условий культивирования с возможностью изменения различных параметров с целью оптимизации производственного процесса. Для создания штамма-продуцента анальгетического пептида был выбран штамм *E. coli* BL21(DE3). Клетки штамма были трансформированы плазмидой, содержащей последовательность, кодирующую гибридный белок, в который входят гексагистидиновая метка, белок-партнер SMT3 и пептид HCRG21. SMT3 распознается и высвобождается специфической протеазой Ulp1, применение которой, в отличие от часто используемого в лабораторной практике бромциана, позволит использовать получаемый пептид в медицинских целях.

* Исследование выполнено за счет средств субсидии федерального бюджета в рамках реализации Программы развития Дальневосточного федерального университета в рамках Программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

В результате трансформации был получен штамм-продуцент BL21(DE3)/pSMT3_HCRG21 [6, 7], для которого были проведены испытания по определению генетической стабильности. Показано, что при последовательных пересевах в пределах 140 генераций количество жизнеспособных клеток культуры штамма и биосинтетическая активность культуры, определяемая количеством гибридного белка, остаются стабильными и во всех клонах присутствует пДНК, содержащая SMT3_HCRG21-кодирующую последовательность.

Таким образом, полученный штамм-продуцент выдержал необходимые испытания и будет использован для дальнейшего производства активной фармакологической субстанции анальгетического пептида HCRG21.

Литература

1. Monastyrnaya M., Peigneur S., Zelepuga E. et al. Kunitz-type peptide HCRG21 from the sea anemone *Heteractis crispa* is a full antagonist of the TRPV1 receptor // *Marine Drugs*. 2016. Vol. 14, No. 12. P. 229–249.
2. Синцова О. В., Паликов В. А., Паликова Ю. А. и др. Пептидный блокатор ионного канала TRPV1 проявляет длительный анальгетический эффект в модели тепловой стимуляции // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2020. Т. 493, № 1. С. 423–426.
3. Sintsova O., Gladkikh I., Klimovich A. et al. TRPV1 blocker HCRG21 suppresses TNF- α production and prevents the development of edema and hypersensitivity in carrageenan-induced acute local inflammation // *Biomedicines*. 2021. Vol. 9, No. 7.
4. Лейченко Е. В., Синцова О. В., Гладких И. Н. и др. Средство пролонгированного анальгетического действия: патент РСТ/RU 2021/050133, WO 2021/235983 A1; опубл. 25.11.2021.
5. Salat K., Moniczewski A., Librowski T. Transient receptor potential channels — emerging novel drug targets for the treatment of pain // *Current Medicinal Chemistry*. 2013. Vol. 20. P. 1409–1436.
6. Tereshin M. N., Komyakova A. M., Stepanenko V. N. et al. Optimized method for the recombinant production of a sea anemone's peptide // *Mendeleev Communications*. 2022. Vol. 32, No. 6. P. 745–746.
7. Терешин М. Н., Степаненко В. Н., Лейченко Е. В. и др. Рекомбинантная плазмидная ДНК pSMT3_HCRG21, кодирующая гибридный белок SMT3-HCRG21, штамм бактерий *Escherichia coli* BL21(DE3)/pSMT3_HCRG21 — продуцент анальгетического пептида HCRG21 и способ получения рекомбинантного анальгетического пептида HCRG21: патент РФ 2798545; дата приоритета 03.10.2022.