

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.02/30.12.2019.К/В.37.01 РАҚАМЛИ
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

САСМАКОВ СОБИРДЖАН АНАРМАТОВИЧ

**ХУЖАЙРАЛАРНИНГ РЕКОМБИНАНТ ОҚСИЛЛАР ОЛИШ ВА
БИОЛОГИК ФАОЛЛИКНИ ТЕКШИРИШ МАҚСАДИДА ГЕНЕТИК
ТРАНСФОРМАЦИЯСИ**

02.00.10-Биоорганик кимё

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ ДОКТОРИ (DSc)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2021

**Биология фанлари доктори (DSc) диссертацияси автореферати
мундарижаси**

**Оглавление автореферата диссертации доктора наук (DSc) по
биологическим наукам**

**Contents of dissertation abstract of doctoral dissertation (DSc)
on biological sciences**

Сасмаков Собирджан Анарматович

Хужайраларнинг рекомбинант оксиллар олиш ва биологик фаолликни
текшириш мақсадида генетик трансформацияси.....5

Сасмаков Собирджан Анарматович

Генетическая трансформация клеток для получения рекомбинантных
белков и исследования биологической активности.....29

Sasmakov Sobirdjan Anarmatovich

Genetic transformation of cells for the obtaining of recombinant proteins and
the study of biological activity.....55

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ

List of published works.....60

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.02/30.12.2019.К/В.37.01 РАҚАМЛИ
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

САСМАКОВ СОБИРДЖАН АНАРМАТОВИЧ

**ХУЖАЙРАЛАРНИНГ РЕКОМБИНАНТ ОҚСИЛЛАР ОЛИШ ВА
БИОЛОГИК ФАОЛЛИКНИ ТЕКШИРИШ МАҚСАДИДА ГЕНЕТИК
ТРАНСФОРМАЦИЯСИ**

02.00.10-Биоорганик кимё

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ ДОКТОРИ (DSc)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2021

Фан доктори (DSc) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2021.4.DSc/B151 рақам билан рўйхатга олинган.

Диссертация ўсимлик моддалари кимёси институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (рус, ўзбек, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифаси (www.biochem.uz) ва «ZiyoNet» Ахборот-таълим порталида (www.ziynet.uz) жойлаштирилган.

Илмий маслаҳатчи: Азимова Шахноз Садыковна
биология фанлари доктори, профессор

Расмий оппонентлар: Ахунов Али Ахунович
биология фанлари доктори, профессор
Далимова Сурайё Нигмановна
биология фанлари доктори, профессор
Раҳманбердиева Рано Каримовна
кимё фанлари доктори


Етакчи ташкилот: Тошкент фармацевтика институти

Диссертация химояси Биоорганик кимё институти ҳузуридаги DSc.02/30.12.2019.K/B.37.01 рақамли Илмий кенгашининг 2021 йил «__» _____ соат _____ даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100125, Тошкент ш., Мирзо Улутбек кўч., 83. Тел.: (+99871) 262-35-40, факс: (+99871) 262-70-63.

Диссертация билан Биоорганик кимё институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (_____ рақами билан рўйхатларга олинган). Манзил: 100125, Тошкент ш., Мирзо Улутбек кўч., 83. Тел.: (+99871) 262-35-40, факс: (+99871) 262-70-63, e-mail: shsha@mail.ru.

Диссертация автореферати 2021 йил «__» _____ куни тарқатилди.
(2021 йил «__» _____ даги _____ рақамли реестр баённомаси).




Ш.И. Салихов
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
раиси, б.ф.д., академик


Ш.А. Шомуротов
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
илмий котиби, к.ф.д.


М.Б. Гафуров
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
қошидаги илмий семинар раиси, к.ф.д.

КИРИШ (фан доктори (DSc) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Бугунги кунда дунё микёсида вирус, бактериал инфекция ва хавfli ўсма касалликлари соғлиқни сақлаш соҳасидаги энг долзарб муаммолардандир. Шунингдек инфекция қўзғатувчиларининг мавжуд микробга қарши дори воситаларига нисбатан чидамлилигининг (резистентлик) ортиб бораётганлиги ушбу муаммоларни янада чуқурлаштирмоқда. Вирусли касалликларнинг профилактикасига қаратилган асосий чора-тадбир тирик хужайраларда биотехнологик усулда олинган вакцина препаратлари билан эмланиш бўлса, рақ касалликларига қарши курашдаги асосий йўналиш одам организми соғлом тўқима ва тана аъзолари учун кам заҳарли бўлган замонавий препаратларни ишлаб чиқиш ҳамда касалликни эрта ва тўғри ташхислашдан иборатдир. Жумладан, жаҳон соғлиқни сақлаш ташкилоти (ЖССТ) маълумотларига кўра бугунги кунда дунёда 296 млн.дан ортиқ одам гепатит В вируси (HBV) билан сурункали зарарланган бўлиб, унинг салбий оқибатлари натижасида йилига деярли 1 миллион киши нобуд бўлади ва 1,5 млн.га яқин янги юктириб олиш ҳолатлари аниқланади. HBV вакциналарига бўлган талабнинг юқорилиги, ҳамда доимий равишда мутацияга учровчи вирусга қарши энг яхши ҳимояни таъминлайдиган рекомбинант янги самарали вакциналарни яратиш ҳамон долзарб вазифа бўлиб қолмоқда. Шунингдек одам репродуктив ҳолатини диагностикаси, ҳамда қўқрак ва тухумдон саратонини даволашга тавсия этилган Мюллер ингибирилловчи субстанцияси (MIS) ҳозирги кунда СНО хужайраларида жуда кам унум билан олинмоқда ва шу муносабат билан ҳозирги вақтда физиологик фаол, яъни табиий аналогидан деярли фарқ қилмайдиган ва юқори унум билан тегишли оксил синтезини таъминлайдиган мақбул экспрессия тизимини танлаш долзарб вазифалардан ҳисобланади.

Дунёда ушбу мақсадда ген муҳандислиги - рекомбинант ДНК технологиялари ёрдамида тирик хужайраларнинг генетик трансформацияси, рекомбинант ДНК клонлаш ва улар асосида керакли оксилларнинг синтезини амалга ошириш, шунингдек моддаларнинг антимикроб фаоллигини текшириш мақсадида маълум антибиотикларга чидамли микроорганизмлар штамmlарини олиш борасида илмий изланишлар олиб борилмоқда. Бу борада биологик фаол рекомбинант оксилларни турли хил хужайра экспрессия тизимларида олишнинг самарали усулларини ишлаб чиқишга, рекомбинант микроорганизм штамmlарида *in vitro* биологик тадиқиқотларни амалга оширишга алоҳида эътибор берилмоқда.

Республикамызда рекомбинант оксиллар асосида дори воситалари ва диагностикаларни ишлаб чиқиш борасидаги бир қатор инновацион ишланмаларни амалиётга татбиқ этишда муайян илмий-амалий натижаларга эришилмоқда. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясининг 4 - йўналишида фармацевтика саноатини янада ривожлантириш, тиббиёт муассасалари ва аҳолини арзон, сифатли дори воситалари ва тиббиёт буюмлари билан таъминланишини яхшилаш юзасидан

муҳим вазифалар белгилаб берилган¹. Ушбу вазифалардан келиб чиқиб, биологик фаол рекомбинант оксилларни олиш, антибактериал ва замбуруғларга қарши фаолликка эга янги бирикмаларни аниқлаш келгусида самарали дори воситалари ва диагностикаларни яратишда муҳим аҳамиятга эгадир.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 14 февраль 2018 йилдаги ПҚ-3532-сон «Фармацевтика тармоғини жадал ривожлантириш бўйича қўшимча чора-тадбирлар тўғрисида»ги, 2019 йил 6 майдаги ПҚ-4310-сон «Тиббиёт ва фармацевтика таълими ва илм-фани тизимини янада ривожлантириш чора-тадбирлари тўғрисида»ги Қарорлари ва 7 февраль 2017 йилдаги ПФ-4947-сон «2017-2021 йилларда Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантиришнинг бешта устувор йўналиши бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги, 10 апрель 2019 йилдаги ПФ-5707-сон «2019-2021 йилларда республиканинг фармацевтика тармоғини янада жадал ривожлантириш чора-тадбирлари тўғрисида»ги Фармонларида ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга мазкур диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот Республика Фан ва технологиялари ривожланишининг «Тиббиёт ва фармакология» - VI устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий-тадқиқотлар шарҳи².

Биологик фаол рекомбинант оксилларни турли хил экспрессия тизимларида инфекция ва ижтимоий аҳамиятга эга касалликларнинг профилактикаси, даволаш ва тапхислаш учун вакцина, дори препаратлари ва диагностикалар яратиш, шунингдек ўсимликлардан ажратиб олинган табиий бирикмалар ва уларнинг синтетик ҳосилаларининг антимикроб фаоллигини аниқлашга йўналтирилган илмий изланишлар жаҳоннинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасалари, жумладан, National Center for Natural Product Research (АҚШ), National Institutes of Health (АҚШ), Max-Planck-Instituts, Leibniz-Instituts, Helmholtz Centre for Infection Research (Германия), Chinese Academy of Medical Sciences, Pekin Union Medical College (Хитой), Россия ФА (РАН) Биоорганик кимё институти, шунингдек Pfizer Inc. (АҚШ), Roche (Швейцария), Novartis (Швейцария), Jonson & Jonson (АҚШ), Merck & Co Inc. (АҚШ), Gilead Sciences Inc. (АҚШ), Amgen Inc. (АҚШ), Sanofi (Франция), Serum Institute of India (Ҳиндистон) ва Ўзбекистон Республикаси Фанлар Академияси Ўсимлик моддалари кимёси институти (Ўзбекистон), Биоорганик кимё институти (Ўзбекистон) да олиб борилмоқда.

Pichia pastoris ачитки ва *Bombux mori* бакуловирус/ҳашарот экспрессия тизимларида рекомбинант оксилларни олиш, шунингдек патоген микроорганизм культураларида *in vitro* антимикроб фаолликни аниқлашга оид

¹ Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «2017-2021 йилларда Ўзбекистон Республикасини ривожлантиришнинг бешта устувор йўналиши бўйича Ҳаракатлар стратегияси» тўғрисидаги Фармони.

² Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий тадқиқотлар шарҳи <https://www.sciencedirect.com/>, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>, <https://scholar.google.com/> ва бошқа манбалар асосида тайёрланган.

жаҳонда олиб борилган тадқиқотлар натижасида бир қатор, жумладан, куйидаги илмий натижалар олинган: *Pichia pastoris* ачитқи хужайраларида 70 дан ортиқ тиббиётда ишлатиладиган рекомбинант оксиллар, жумладан рекомбинант гепатит В вакцинаси, альфа-интерферон, рекомбинант инсулин 1999, 2002 ва 2003 йиллардан бошлаб Shanta Biotech ва Biocon, рекомбинант одам қон зардоби альбумини эса Mitsubishi Tanabe Pharma компанияси томонидан кейинги йилларда саноат миқёсида кўп миқдорда ишлаб чиқарилмоқда. ЖССТ томонидан маъқулланган, бачадон бўйни саратон касаллигини келтириб чиқарадиган одам папилломавируси (HPV) штаммларига қарши - CERVARIX®, простата саратонига қарши - PROVENGE® ва мавсумий гриппга қарши - FLUBLOK® вакциналари бакуловирус/ҳашарот хужайралари тизимида олиниб кенг миқёсда тиббиётда ишлатилиб келинмоқда. Микробларга қарши фаоллик намоён этувчи ўсимликлардан ажратиб олинган фенол/полифеноллар, терпеноидлар, эфир мойлари, алкалоидлар, лектинлар ва полипептидлар, полиацетиленлар қаторига кирувчи бир қатор бирикмалар аниқланган бўлиб, улар асосида янги дори воситалари яратилмоқда.

Дунёда рекомбинант оксилларни олиш ва биологик фаол моддаларни *in vitro* тадқиқ этиш бўйича қатор, жумладан, куйидаги устувор йўналишларда тадқиқотлар олиб борилмоқда, жумладан *Pichia pastoris* ачитқиси ва *Bombyx mori* бакуловирус/ҳашарот экспрессия тизимлари учун янги рекомбинант плазмидалар клонлаш ва улар асосида синтетик оксилларнинг юкори унумдор штамм-продуцентларини олиш, антибиотикларга чидамли микроорганизм штаммларини яратиш ва уларда моддаларнинг *in vitro* скринингини амалга ошириш.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Бир қатор хорижий етакчи илмий марказларда J.M. Cregg, H. Lünsdorf, A. Adnan, C.A. Guzmán, A. Vassileva, E.Y. Park, A.M. Ischenko, D.T. MacLaughlin каби хорижлик олимлар томонидан *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* каби ачитқи экспрессия тизимларида гепатит В вирусининг юза антигенларига жавоб берувчи рекомбинант оксилларни, шунингдек рекомбинант MIS оксиллини СНО хужайраларида олиш ва биологик фаоллигини ўрганишга қаратилган тадқиқотлар олиб борилган ва бугунги кунда ҳам давом эттирилмоқда.

Республикамик миқёсида ҳам бу борада илмий тадқиқот ишлари амалга оширилган бўлиб, муайян илмий ҳамда амалий натижаларга эришилган. Жумладан, проф. Ш.С. Азимова раҳбарлигида гепатит В вирусининг рекомбинант PreS2-S оксиллини тут ипак қурти (*Bombyx mori*) экспрессия тизимида олишга имкон берадиган генетик конструкциялар яратилган, шунингдек моддаларнинг *in vitro* цитотоксик фаоллигини ўрганиш бўйича бир қатор илмий тадқиқотлар амалга оширилиб, олинган натижалар ушбу йўналишдаги тадқиқотларнинг долзарблигини кўрсатади.

Диссертация мавзусининг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти ЎЗР ФА Ўсимлик моддалари кимёси институтининг

илмий - амалий тадқиқот ишлари режасининг ФА-Ф6-Т198 «Биологик фаол моддаларни хужайра метаболизмига таъсирини ўрганиш» (2012-2016 йй.), КА-6-004 «*Bombyx mori* турли зотларида рекомбинант бакуловирус олиш усулини ишлаб чиқиш» (2015-2017 йй.), ВА-ФА-Ф-6-009 «Табиий бирикмалар ва уларни синтетик ҳосилаларининг цитотоксик, антибактериал, замбуруғга қарши ва антиоксидант фаоллигини ўрганиш» (2017-2020 йй.) ПЗ-20170926277 “Рекомбинант оқсилларни янги диагностика ва дори воситалари яратиш мақсадида *Pichia pastoris* ачитқи экспрессия тизимида олишни ишлаб чиқиш” (2018-2020 йй.) мавзуларидаги амалий ва фундаментал тадқиқот лойиҳалари доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади. *Pichia pastoris* ачитқи хужайралари ва тут ипак қурти (*Bombyx mori*) личинкаларида рекомбинант PreS2-S, S ва MIS - Мюллер ингибирловчи субстанцияси оқсилларини олиш, шунингдек антибиотикларга чидамли микроорганизмлар штамmlарини яратиш ва моддаларнинг антибактериал ҳамда замбуруғларга қарши фаолликларини аниқлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

гепатит В вируси (HBV) PreS2-S оқсилни *Pichia pastoris* ачитқиларида кодловчи pPIC3.5-PreS2-S ва pPIC9-PreS2-S рекомбинант плазмидаларини клонлаштириш ва клонлаштирилган PreS2-S гени ДНК фрагментининг нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш;

клонлаштирилган рекомбинант плазмидалар асосида PreS2-S оқсилни экспрессияловчи янги рекомбинант GS115 *Pichia pastoris* ачитқи штамmlарини олиш;

ПААГ электрофорез, ИФА ва Иммуноблот таҳлиллари ёрдамида рекомбинант PreS2-S оқсилнинг экспрессияси ва антигенлик хусусиятларини тавсифлаш;

рекомбинант *Pichia pastoris* pPIC9-PreS2-S ва pPIC9-S штамmlарини кўпайтиришнинг технологик усуллари ишлаб чиқиш;

Pichia pastoris ачитқи хужайраларидан тегишли рекомбинант оқсилларни ажратиб олиш ва тозалаш усуллари ишлаб чиқиш;

олинган рекомбинант оқсилларнинг *in vivo* иммуногенлик хусусиятларини ўрганиш;

MIS (Мюллер ингибирловчи субстанцияси) оқсилни кодловчи рекомбинант бакуловирус плазмидасини клонлаштириш ва рекомбинант плазмида таркибидаги MIS гени ДНК фрагментининг нуклеотид кетма кетлигини аниқлаш;

MIS рекомбинант оқсилни тут ипак қурти личинкаларидаги синтезини амалга ошириш ва энг кўп миқдорда оқсил ишлаб чиқарадиган маҳаллий тут ипак қурти зотларини аниқлаш;

олинган рекомбинант MIS оқсилни ПААГ электрофорез ва иммуноблотнинг усуллари ёрдамида тавсифлаш;

антибиотикларга чидамли микроорганизмлар штамmlарини клонлаштириш;

табий бирикмалар ва уларнинг синтетик ҳосилаларининг антибактериал ва замбуруғларга қарши *in vitro* фаолликларини аниқлаш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида *Pichia pastoris* ачитқиси, *Bombyx mori* хужайра культураси, ёввойи типдаги *Bombyx mori* ядровий полиэдроз вируси, рPIC3.5, рPIC9 ва рВасРАК8 трансфер векторлари, рекомбинант PreS2-S, S ва MIS оксиллари, турли зотларга мансуб тут ипак қурти личинкалари, антибиотикларга чидамлилиги генини сақловчи плазмидалар, грам-мусбат ва грам-манфий бактерия штаммлари, ҳамда *Candida albicans* замбуруғи, ўсимлик экстрактлари, индивидуал бирикмалар ва уларнинг синтетик ҳосилалари танланган.

Тадқиқотнинг предмети *Pichia pastoris* ачитқи хужайраларида рекомбинант PreS2-S ва S оксилларининг экспрессияси, рекомбинант MIS оксилларининг *Bombyx mori* турли зотларга мансуб личинкаларидаги синтези, олинган рекомбинант оксилларнинг хроматографик, гел-электрофоретик ҳамда антигенлик хусусиятлари, антибиотикларга чидамли микроорганизм штаммларини клонлаштириш, моддаларнинг антибактериал ва замбуруғларга қарши фаоллиги ҳисобланади.

Тадқиқотнинг усуллари. Тадқиқотлар жараёнида биоорганик кимё, биокимё ва биотехнология (олигонуклеотидлар синтез қилиш, ДНК нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш, генларни клонлаштириш, оксилларни миқдор ва сифат жиҳатидан аниқлаш, тозалаш, спектрофотометрия усуллари, ИФА, Иммуноблот таҳлилари, *in vitro* биологик тестлар ва б.) усулларидан фойдаланилган.

Диссертация тадқиқотининг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат: илк бор Гепатит В вируси (HBV) юза антигенини PreS2-S (865 н.ж.) *Pichia pastoris* ачитқиларида кодловчи рPIC3.5-PreS2-S ва рPIC9- PreS2-S рекомбинант плазмидалари клонлаштирилган;

клонлаштирилган рекомбинант плазмидалар асосида PreS2-S оксилни экспрессияловчи янги рекомбинант GS115 *Pichia pastoris* ачитқи штаммлари олинган;

илк бор *Pichia pastoris* рекомбинант рPIC9-PreS2-S ва рPIC9-S штаммларини қўпайтиришнинг технологик шарт-шароитлари аниқланган;

илк бор *Pichia pastoris* ачитқи хужайраларидан рекомбинант PreS2-S ва S оксилларини ажратиб олиш ҳамда тозалаш усуллари ишлаб чиқилган;

илк бор тут ипак қурти - *Bombyx mori* личинкаларида рекомбинант MIS - Мюллер ингибирловчи субстанциясини кодлайдиган рекомбинант рВасРАК-8-Polh-MIS плазмидаси клонлаштирилган ва унинг асосида рекомбинант бақуловирис яратилган;

илк бор рекомбинант MIS оксилларининг синтези маҳаллий тут ипак қурти личинкаларида амалга оширилган. ПААГ электрофорез ва иммуноблотинг таҳлилари асосида рекомбинант MIS оксиги тегишли молекуляр оғирлик 70 кДа (мономер) ва одам MIS оксигига хос бўлган антигенлик хусусиятларини намоён этиши аниқланган;

клонлаш ёрдамида *Escherichia coli* бактерияси ва *Pichia pastoris* ачитқиларининг маълум антибиотикларга нисбатан резистент штамлари олинган;

табiiй ва синтетик келиб чиқишга эга жами 350 дан ортиқ намунанинг, жумладан Ўзбекистон флорасига мансуб 90 хилдан ортиқ ўсимликдан ажратиб олинган экстрактлар, эфир мойлари, индивидуал моддалар ва уларнинг синтетик ҳосилаларининг антибактериал ва замбуруғларга қарши *in vitro* скрининги амалга оширилган;

1,11-бис- (6,7-диметокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-1-ил) ундекан *Candida albicans* замбуруғ штамми, *Cnicus* sp., *Potentilla asiatica* ўсимликларининг экстрактлари грам-мусбат ва грам-манфiiй бактерия штамлари, жумладан ампициллин ва канамицинга резистент штаммларга нисбатан яққол ифодаланган фаоллик намоён этиши аниқланган.

Тадқиқотнинг амалий натижаси қуйидагилардан иборат:

Pichia pastoris ачитқиси, *Bombyx mori* ҳашароти бакуловириси ва бактерия ҳужайраларининг рекомбинант оксиллар олиш ва биологик фаолликни текшириш мақсадида генетик трансформацияси натижасида мақсадли Гепатит В вируси рекомбинант PreS2-S, S ва MIS оксиллари, шунингдек антибиотикларга чидамли бактерия штамлари олинган.

Pichia pastoris ачитқи ҳужайраларида PreS2-S ва S оксилларини кодлайдиган рекомбинант плазмидаларни клонлаштириш усуллари ишлаб чиқилган;

клонлаштирилган рекомбинант «PreS2-S» ДНК фрагментининг нуклеотид кетма-кетлиги аниқланиб, HBV D генотиپига, жумладан Ўзбекистонда тарқалган турига мос эканлиги ва мавжуд HBV вакциналаридан 2 та қўшимча антигендетерминанга сақлайдиган вакцина яратиш учун субстанция сифатида хизмат қилиши мумкинлиги кўрсатиб берилган;

рекомбинант *Pichia pastoris* pPIC9-PreS2-S ва pPIC9-S штамларини кўпайтиришнинг энг кўп миқдорда ҳужайра биомассаси (420-430 г/л), яъни PreS2-S ва S оксилларини ўртача ≈10 мг/л (1000 болалар вакцина дозаси/л) миқдорига тенг субстанция синтезига олиб келадиган шарт-шароитлари (озука муҳити таркиби, вақт, рН, DO, ҳарорат режими) аниқланган;

Pichia pastoris ачитқи ҳужайраларидан тегишли рекомбинант оксилларни ажратиб олиш ва тозалаш усуллари ишлаб чиқилган. Ачитқи ҳужайраларини гомогенизациялашнинг, аммоний сульфат тузи билан босқичли чўктиришнинг, Sephadex G-200 SF, DEAE Sepharose FF ва Supredex 75pg сорбентларидаги босқичли хроматографиянинг энг мақбул шароитлари аниқланган;

тажриба ҳайвонларида амалга оширилган иммуногенлик таҳлиллари рекомбинант S ва PreS2-S оксиллари юқори иммун жавоб намоён этишини кўрсатган;

тут ипак қурти личинкаларида функционал фаол рекомбинант MIS оксилнинг синтези амалга оширилган;

рекомбинант MIS оксилнинг синтез даражасини қиёсий таҳлил этиш асосида энг кўп миқдорда тўғри пост-трансляцион модификацияли оксил

синтезловчи “Марварид” зоти аниқланиб, ушбу зотни биотехнологияда қўллаш имкониятлари кўрсатиб берилган;

Escherichia coli бактерияси ва *Pichia pastoris* ачитқиларининг - ампициллин, карбенициллин, неомидин, канамицин, генетицин (гентамицин В1) ва зеоцин (флеомицин D1) антибиотикларига нисбатан резистент штаммлари олинган;

табиий ва синтетик келиб чиқишга эга моддаларнинг антибактериал ва замбуруғларга қарши *in vitro* скрининги амалга оширилган ва улар орасидан микробларга қарши яққол фаоллик намоён этадиган намуналар танлаб олинган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги замонавий биоорганик, биокимё ва молекуляр биология усулларини қўллаш ёрдамида олинганлиги билан тасдиқланади. Натижалар замонавий аналитик ва статистик усуллар ёрдамида таҳлил қилинган. Бунинг тасдиғи сифатида мутахассислар томонидан эксперт хулосалари, ҳамда республика ва халқаро илмий анжуманларда муҳокамадан ўтганлиги, тақриз қилинувчи хорижий илмий нашрларда чоп этилганлиги ва ЎзР патентлари олингани хизмат қилади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Мазкур тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти шундан иборатки, илк марта *Pichia pastoris* ачитқиларида Гепатит В вируси юза антигенлари рекомбинант PreS2-S ва S оқсилларини кодлайдиган янги плазмидалар клонлаштирилганлиги, шунингдек илк бор тут ипак қурти - *Bombyx mori* личинкаларида рекомбинант MIS (Мюллер ингибирловчи субстанцияси) оқсилни экспрессияловчи янги рекомбинант бакуловирус яратилганлиги, шунингдек рекомбинант плазмидалар асосида антибиотикларга чидамли микроорганизмлар штаммлари олинганлиги, ҳамда Ўзбекистон флорасига мансуб маҳаллий ўсимликлардан ажратиб олинган 350 дан ортиқ намуна, жумладан экстрактлар, эфир мойлари, индивидуал моддалар ва уларнинг синтетик ҳосилаларининг антибактериал ва замбуруғларга қарши *in vitro* скрининги амалга оширилганлиги билан белгиланади. Тадқиқот иши натижаларидан биоорганик кимё, биотехнология, фармацевтика ва фитокимё соҳаларида рекомбинант оқсилларни олишда, шунингдек табиий бирикмаларнинг биологик фаолликларини ўрганишда ўқув ва илмий тадқиқот ишларида фойдаланиш мумкинлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти клонлаштирилган рекомбинант плазмидалар асосида гепатит В вирусига қарши янги самарали вакцина, ҳамда диагностик тест тизимлар яратиш учун асос бўладиган тегишли PreS2-S ва S оқсилларини экспрессияловчи янги рекомбинант *Pichia pastoris* ачитқи штамм-продуцентлари олинганлиги, шунингдек энг кўп миқдорда MIS оқсилни синтезловчи маҳаллий “Марварид” зотли тут ипак қурти аниқланиб, ушбу зотни биотехнологияда қўллаш имкониятлари кўрсатиб берилганлиги, *in vitro* тадқиқотлар натижасида аниқланган антибактериал ва замбуруғларга қарши фаол бирикмалар янги дори воситалари яратиш учун асос бўлиб хизмат қилиш имконини берганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. *Pichia pastoris*, *Bombyx mori* ва бактерия хужайраларининг рекомбинант оқсиллар олиш ва биологик фаолликни текшириш мақсадида генетик трансформациясини тадқиқ қилиш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

тут ипак қурти (*Bombyx mori*) личинкаларида юқори унум билан рекомбинант оқсил синтезини таъминловчи зотни аниқлаш учун Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлигидан ихтирога патент олинган (UZ №IAP 20160473). Натижада, маҳаллий зотга мансуб тут ипак қурти личинкаларидан биотехнология саноатида фойдаланиш имконияти яратилган;

замбуруғга қарши фаолликка эга булган 1,11-бис-(6,7-диметокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-1-ил) ундекан учун Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлигидан ихтирога патент олинган (UZ №IAP 05940, 2019 й.). Натижада, ушбу бирикманинг тиббиётда замбуруғларга қарши восита сифатида фойдаланиш имконияти яратилган;

рекомбинант PreS2-S оқсилни кодловчи нуклеотидлар кетма-кетлиги NCBI GenBank ID MT023508 (Биотехнология маълумотлари миллий маркази, АҚШ, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MT023508.1/>) ва EMBL-EBI LR745788 (<https://www.ebi.ac.uk/>) халқаро маълумотлар базасида рўйхатдан ўтказилган. Натижада, келтирилган маълумотлар аналогик оқсилларнинг қиёсий таҳлилини халқаро миқёсда амалга ошириш имконини берган;

Pichia pastoris ачитқисида рекомбинант S оқсилни кодловчи ген кетма-кетлиги NCBI GenBank ID MT023509 (Биотехнология маълумотлари миллий маркази, АҚШ, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MT023509.1/>) ва EMBL-EBI LR746134 (<https://www.ebi.ac.uk/>) халқаро маълумотлар базасида рўйхатдан ўтказилган. Натижада, ушбу йўналишда олиб борилаётган илмий-тадқиқотларда аналогик оқсилларнинг аминокислота кетма-кетлигини, ҳамда антигенлик хусусиятларини қиёсий таҳлил қилиш имконини берган;

рекомбинант MIS оқсилни кодловчи нуклеотидлар кетма-кетлиги NCBI (Биотехнология маълумотлари миллий маркази, АҚШ) халқаро маълумотлар базасига киритилган ва GenBank ID 2480761 Seq3 MZ556958 идентификатори билан рўйхатдан ўтказилган. Натижада, ушбу маълумотлар аналогик оқсилларнинг қиёсий таҳлилини дунё миқёсида амалга оширишга имконият яратган;

рекомбинант S оқсилни синтезловчи *Pichia pastoris* ачитқи штамми ЎЗР ФА Микробиология институти саноат аҳамиятига эга микроорганизмлар коллекциясига сақлаш учун тошпирилган ва унга паспорт олинган (коллекция қайди № СКБ-186, 05.03.2020 й.). Натижада, республика саноат аҳамиятига эга микроорганизмлар коллекцияси янги штамм продуцент билан бойитиш имконини берган;

табiiй бирикмалар: ўсимлик манбалари, тузилиши ва биологик хусусиятлари бўйича бутун дунё илмий маълумотлари тўпламиб халқаро Springer нашриетида 2 томлик (1070 бет) тўплам – Handbook- “Natural Compounds: Plant Sources, Structure and Properties” ISBN: 978-1-4614-0540-5; 2013; (New York: Springer). Triterpene glycosides. V.5, Part 1. P.1-532 and Part 2. P.533-1070. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0541-2> чоп этилган бўлиб, унда

табiiй бирикмалар, хусусан тритерпенли гликозидларнинг физик-кимевий ва биологик хоссалари жамланган. Натижада, ушбу маълумотлардан дунё микёсида фойдаланиш имконияти яратилган;

табiiй ва синтетик келиб чиқишга эга бирикмаларнинг антибактериал ва замбуруғларга қарши фаоллигини ўрганиш бўйича илмий натижалар юкори импакт-факторга эга 40 дан ортиқ хорижий илмий журналларда қўлланилган: (Antibiotics, 2020, 9(8), 441, IF=4.639; Journal of Ethnopharmacology 2020, 250, 112466, IF=4.360; Toxins, 2019, 11(10), 598, JCR IF=4.54; Molecules, 2021, 26(11), 3193, IF=4.411; Frontiers in microbiology 2020, 11, 424, IF=5.640, Natural product research, 2021, 35(4), 696-701, IF=2.158 ва бошқалар). Натижада, антибактериал ва замбуруғларга қарши фаоллик бўйича скрининг натижаларининг қўлланилиши биологик фаол моддалар бўйича маълумотларни қўлга киритишга ва ўсимлик объеклари кимевий таркибини мақсадли ўрганиш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Тадқиқот иши натижалари 43 та, жумладан 28 та республика ва 15 та халқаро илмий-амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 89 та илмий иш чоп этилган бўлиб, улардан 2 та халқаро Springer нашриётида тўплам (Handbook), 2 та патент, Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясининг фан доктори диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этиш учун тавсия этилган илмий нашрларда 38 та мақола, жумладан, 16 таси Республика ва 22 таси хорижий журналларда нашр этилган, патент учун 3 та талабнома тошпирилган.

Диссертациянинг ҳажми ва тузилиши. Диссертация таркиби кириш, бешта боб, хулосалар, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 200 бетни ташкил этади.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурийлиги, тадқиқотнинг мақсад ва вазифалари асослаб берилган, объект ва предметлари тавсифланган, тадқиқотнинг Ўзбекистон Республикасида фан ва технологияларни ривожлантиришнинг устувор йўналишларига мувофиқлиги келтирилган, унинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг назарий ва амалий аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертациянинг тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «**Биотехнологияда турли ҳужайра культураларидан фойдаланиш**» деб номланган биринчи бобида ҳужайраларнинг генетик трансформацияси асосида биотехнологик усулда, рекомбинант ДНК технологиялари ёрдамида биологик фаол оқсилларнинг синтезини амалга ошириш, жумладан *Pichia pastoris* ачитки ҳужайралари ва бакуловирус/*Bombux mori* ҳашарот ҳужайралари экспрессия тизимларида рекомбинант оқсилларни олиш ҳақида маълумотлар батафсил келтириб

ўтилган. Шунингдек, рекомбинант плазмидалар асосида биологик фаолликларни ўрганиш мақсадида маълум антибиотикларга чидамли микроорганизмлар штаммларини олиш, *in vitro* антибактериал ва замбуруғларга қарши тестларда ишлатиладиган микроорганизм штаммлари ва уларда моддаларнинг биологик фаоллигини текшириш ҳақидаги хорижий ва маҳаллий илмий адабиётлар шарҳи баён этилган.

Диссертациянинг «**Тадқиқот материал ва усуллари**» деб номланган иккинчи бобида *Pichia pastoris* ачитқи ва бакуловирус/*Bombyx mori* ҳашарот хужайралари экспрессия тизимларида рекомбинант оксилларни олиш, шунингдек моддаларнинг антибактериал ва замбуруғларга қарши фаолликларини аниқлаш учун фойдаланилган жиҳоз, материал ва усулларнинг тавсифи баён этилган тажриба қисми келтирилган.

Диссертациянинг учинчи боби «***Pichia pastoris* ачитқисида рекомбинант PreS2-S, S ва GFP оксилларини олиш**» га бағишланган. Бобда Гепатит В вируси юза антигени PreS2-S ва S рекомбинант оксилларини, шунингдек GFP оксилни *Pichia pastoris* ачитқисида олиш мақсадида, керакли ген сакловчи рекомбинант плазмид ДНКларни клонлаштириш, улар асосида рекомбинант штаммларни олиш ва кўпайтиришнинг технологик шарт-шароитларини аниқлаш, олинган рекомбинант оксилларни ажратиб олиш ва тозалаш усулларини ишлаб чиқиш, шунингдек ПААГ электрофорез, ИФА ва иммуноблот усуллари ёрдамида тавсифлаш ва иммуногенлик хусусиятларини ўрганиш натижалари келтирилган.

Керакли ген сакловчи рекомбинант плазмид ДНКларни конструкциялаш

Pichia pastoris ачитқи экспрессия тизими ҳозирги кунда рекомбинант оксиллар олиш учун энг технологик тизимлардан бири ҳисобланади. Арзон озуқа муҳитида кўпайтириш жараёнида кўп миқдордаги хужайра биомассасини тўплаши, эндотоксин ва пирогенларнинг мавжуд эмаслиги, шунингдек рекомбинант оксилларни юқори унум билан синтез қобилияти *Pichia pastoris* ачитқиларининг афзал томонлари ҳисобланади. Тадқиқотларимизда *Pichia pastoris* ачитқи экспрессия тизимида PreS2-S оксилнинг экспрессиясини таъминлайдиган янги рекомбинант плазмидалар клонлаштириш мақсадида *Pichia pastoris* геномининг нуклеотид кетма кетликларини, шу жумладан *AOX1*, *HIS4* промотори ва бошқаларни ўз ичига олган pPIC3.5 (7751 ж.н.) ва pPIC9 (8023 ж.н.) трансфер векторлари ишлатилди. pPIC9 кўшимча равишда алфа-факторнинг (249 ж.н.) оксилларни озуқа муҳитига чиқариш имкониятини берадиган сигнал кетма-кетликларини тутди. Ёт қДНКни мультиклонинг сайтга киритиш (BamHI, XhoI, EcoRI ва б.) оксил аминокислота кетма-кетлигини кодловчи генларни *AOX1* генининг промотори (алкоголь оксидигидрогеназа) назорати остига кўяди. Ушбу плазмидалар керакли генларни *Pichia pastoris* ачитқи хужайралари геномига интеграциялаш имкониятини беради. PreS2-S генининг манбаи сифатида бакуловирус/ҳашарот хужайраси экспрессияси тизимига мўлжалланган pVacPAK-8-Polh-PreS2-S плазмидасидан фойдаланилди. Дастлаб PreS2-S генига жавоб берадиган қДНК фрагменти манбаи бўлган pVacPAK-8-Polh-

PreS2-S рекомбинант плазмидаси ва рPIC3.5, шунингдек рPIC9 трансфер векторлари EcoRI ва NotI рестриктазалари ёрдамида навбати билан гидролизланди. Натижада, рPIC3.5 ва рPIC9 векторлари, шунингдек PreS2-S кДНК фрагментининг учлари "ёпишқок" бўлган ва "йўналиштирилган" лигирлаш имкониятини берадиган нуклеотидлар кетма-кетлиги ҳосил бўлди. Узунлиги 7745 н.ж., 7999 н.ж. ва 965 н.ж. бўлган чизикли ДНК фрагментлари электрофорез ёрдамида 0.7% агарозали гелда электроэлюция усули ёрдамида ажратиб олинди. Олинган кДНК фрагментлари T4 ДНК лигаза ферменти ёрдамида 1:10 нисбатда (вектор ва ген) лигирланди ва *Escherichia coli* NEB-5 α компетент хужайраларига трансформация қилинди. Клонланган плазмид ДНКлар таркибида ампициллинга чидамлилик гени мавжуд бўлиб, бу таркибида плазмид ДНК бўлмаганлардан саралашга имконият беради.

Рекомбинант клонларнинг скрининги гепатит В вирусининг PreS2-S регионига синтез қилинган қуйидаги праймерлардан фойдаланган ҳолда ПЗР усули ёрдамида амалга оширилди.

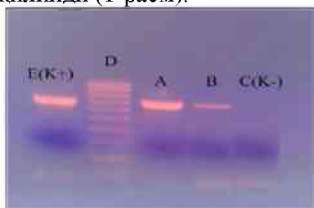
рPIC3.5-PreS2-S учун: 1) 5'-CGGATCCAAAAATGTCTCAGTGGAAAC-3'

2) 5'-TGTTGAATTC AATGTATACCCAAA-3'

рPIC9-PreS2-S: 1) 5'-CCTCGAGAAAAATGTCTCAGTGGAAAC-3'

2) 5'-TGTTGAATTC AATGTATACCCAAA-3'

ПЗР маҳсулотлари электрофорез усули ёрдамида 1% агароза гелида таҳлил қилинди (1-расм).



A – pPIC3.5- PreS2-S;

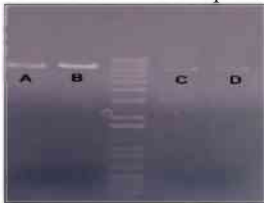
B – pPIC9- PreS2-S; **C (K-)** - HBV "манфий" одам қонидан ажратилган ДНК;

D – ДНК линейка (Маркер);

E (K+) – HBV "мусбат" одам қонидан ажратилган ДНК.

1-расм. Керакли ген сақловчи трансформантларнинг гелъ электрофорези.

Реакция сўнгига 965 н.ж. тенг фрагментнинг борлиги мазкур плазмидаларда PreS2-S кДНК мавжудлигини кўрсатади (2-расм. **A** ва **B** намуналар). Мана шу асосда, ПЗР усули ёрдамида гепатит В вируси ДНКнинг PreS2-S регионини ўз ичига олган клонлар аниқланди. Геннинг плазмидага "тўғри йўналиш"да киритилганини аниқлаш учун қўшимча рестрикция таҳлил ўтказилди. Рекомбинант рPIC3.5- PreS2-S (**A**) ва рPIC9- PreS2-S (**B**) плазмидаларини EcoRI ферменти билан кесилганда 8707 ва 8980 н.ж. га тўғри келадиган чизикли шакллари ҳосил бўлди (2-расм).



A - pPIC3.5-PreS2-S/EcoRI;

B - pPIC9-PreS2-S/EcoRI;

C - pPIC3.5/EcoRI; **D**- pPIC9/EcoRI

2-расм. Рекомбинант плазмидаларнинг рестрикция таҳлили.

NotI рестриктазаси билан кейинги ишлов натижасида ўлчамлари 7.75, 8.023 к.н.ж. ва 965 н.ж. бўлган фрагментлар олиниб, рекомбинант

плазмидаларда гепатит В вируси PreS2-S гени қДНКнинг тўғри йўналтирилганлигини кўрсатади.

Мана шу асосда АОХ1 гени промотори остида тўғри йўналишда жойлаштирилган гепатит В вируси ДНКнинг PreS2-S регионини сақлайдиган рекомбинант плазмидли ДНКлар конструкцияланди.

Тадқиқот доирасида клонлаштирилган рекомбинант плазмидалар таркибидаги “PreS2-S” генини сақловчи ДНК фрагментининг нуклеин кислоталар кетма-кетлиги аниқланди ва Гепатит В вирусининг D генотипига, жумладан Ўзбекистонда кенг тарқалган турига мос келиши аниқланди. Ушбу PreS2-S оксилени кодлайдиган нуклеотидлар кетма-кетлиги аниқланиб NCBI (АҚШ Миллий биотехнология ахборот маркази, GenBankID MT023508, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MT023508.1/>) ва ENA халқаро маълумотлар базасига киритилди (LR745788).

Биз *Pichia pastoris* ачитқи хужайраларида гетерологик оксиллар синтезини баҳолаш учун “модель” сифатида ММ 27 қДа (719 ж.н.) бўлган GFP (яшил флуоресцент оксил) ни танлаб олдик. NCBI маълумотлар базасидан GFP генининг нуклеотидлар кетма кетлиги қиёсий таҳлил қилиниб, тўлиқ ўлчамли GFP генининг амплификацияси ва трансферли векторларга клонлашни назарга тутган ҳолда қуйидаги олигонуклеотидлар синтези амалга оширилди: BamHI 5'-GAAGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGA-3' (F-pPIC3.5); XhoI 5'-TCTCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGA-3' (F-pPIC9); EcoRI 5'-AGGGAATTCCTGTACAGCTCGTCCATG-3' (R).

Рекомбинант pPIC3.5-GFP ва pPIC9-GFP плазмидаларини клонлаш юқоридаги баён этилгани каби амалга оширилди. pPIC3.5 ва pPIC9 трансфер векторларига BamHI/EcoRI ва XhoI/EcoRI рестриктазалари билан кетма-кет равишда ишлов берилди ва чизикли шакллари олинди. Матрица сифатида ЎЗРФА ЎМКИ молекуляр генетика лабораториясида депонирланган рекомбинант pBacPAK8-polh-EGFP плазмидаси ишлатилди. қДНК фрагментлари лигирлангандан сўнг *Escherichia coli* NEB-5 α хужайраларига трансформацияланди. Олинган клонларнинг скрининги ПЗР, шунингдек рестриқцион таҳлиллар ёрдамида амалга оширилди.

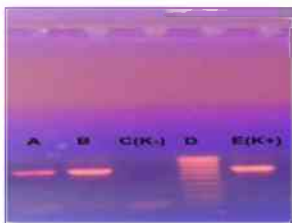
PreS2-S, S ва GFP оксилларини кодлайдиган *Pichia pastoris* ачитқиси рекомбинант штамmlарини олиш.

Ушбу мақсадда pPIC3.5-PreS2-S, pPIC9-PreS2-S, pPIC3.5-GFP ва pPIC9-GFP рекомбинант плазмидалари GS 115 *Pichia pastoris* ачитқи штаммига трансформация қилинди. Рекомбинант плазмидалар *Pichia pastoris* хужайрасига электропорация усули ёрдамида киритилди. Бунда самарали трансформациялаш жараёни плазмидаларни Sac I, Sal I, Stu I ёки Bgl II сайтлари бўйича чизикли шаклга келтириб олиш ва ДНК концентрацияси 0.5 мкг, хужайраларнинг оптик зичлиги OD₆₀₀=2.0 бўлганда трансформантлар сони максимал ҳосил бўлиши аниқланди.

***Pichia pastoris* рекомбинант клонларининг селекциясини амалга ошириш. Рекомбинант оксил синтезловчи штамmlарни саралаш.**

Pichia pastoris GS115 штаммида гистидиннинг синтезига жавоб берувчи гистидинол дегидрогеназа гени (*his4*) мутация қилинган, шу сабабли мазкур

штамм гистидинсиз озука муҳитда ўса олмайди. Клонлаштириш учун танлаб олинган pPIC3.5 ва pPIC9 трансфер векторлари эса натив *HIS4* генини сақлайди ва шу сабабли олинган *Pichia pastoris* рекомбинант штамми гистидинсиз озука муҳитда ўсиш қобилиятига эга бўлади. Биз аввалги тадқиқотларимизда Mut^r ва Mut^s, яъни метанолни қўп ва кам утилизация қилувчи фенотипли *P. pastoris* штаммлари S-HBsAg оксиллини деярли бир хил миқдорда синтез қилишини аниқлаган эдик. Шу сабабли керакли рекомбинант оксилларни синтез қилувчи колониялар ММ (минимум метанол) селектив озука муҳитларида сараланди. Ўсиб чиққан колониялар ПЗР усули ёрдамида таҳлил қилиниб, керакли геннинг GS115 *P. pastoris* геномига интеграцияси тасдиқланди (3-расм).



А – pPIC3.5-S; В – pPIC9-S;
 С (К-) – “HBV манфий” одам қонидан ажратилган ДНК;
 D – ДНК маркер;
 E (К+) – “HBV ижобий” одам қонидан ажратилган ДНК.

3-расм. *P. pastoris* pPIC3.5-PreS2-S ва pPIC9-PreS2-S колонияларининг ПЗР таҳлили.

Саралаб олинган рекомбинант клонларда керакли оксил экспрессияси ҳақиқатдан ҳам содир бўлишини каттик фазали ИФА усули ёрдамида аниқланди. ИФА таҳлили учун “ЎзР ФА ЎМКИ диагностик тест тизимларини ишлаб чиқариш корхонаси” ва Diagnostic Systems (Россия) каби тижорат тўшамларидан фойдаланилди. Қиёслаш стандарти сифатида гепатит В вируси S антигени асосидаги «Hepatitis B Vaccine (rDNA), Serum Institute of India» вакцинасидан фойдаланилди. Тажриба натижалари 1-жадвалда келтирилган. Жадвалдан кўриниб турибдики, танлаб олинган *Pichia pastoris* клонларида рекомбинант PreS2-S оксилнинг самарали синтези амалга ошади.

1-жадвал

***Pichia pastoris* ҳужайраларида PreS2-S оксил экспрессиясининг таҳлили**

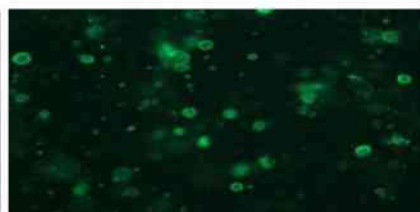
Текширилаётган намуна	Суюлтириш даражаси	ИФА тест синови натижалари (OD=450 нм)
<i>Pichia pastoris</i> дан ажратилган рекомбинант PreS2-S сақлайдиган умумий оксил (≈5 мг/мл)	1:1000	2.870
	1:10000	0.591
«Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India»	1:1000	≥ 3000 (out)
	1:10000	0.410
Тўшамдаги ижобий назорат стандарти (HBV билан касалланган одам қон зардоби)		≥ 3000
Тўшамдаги салбий назорат стандарти (соғлом одам қон зардоби)		0.095

Рекомбинант GFP оксиллини синтезлайдиган *Pichia pastoris* pPIC3.5-GFP ва pPIC9-GFP рекомбинант клонларининг селекцияси юқоридаги каби ПЗР усули ёрдамида амалга оширилди. Олинган натижалар “GFP гени” GS115 *Pichia pastoris* ачиткиларига интеграцияланганлигини кўрсатади (4-расм).

Ҳужайралардаги оксил экспрессияси GFP-специфик флуоресценция орқали визуализация қилинди (5-расм).



4-расм. pPIC3,5-GFP ва pPIC9-GFP рекомбинант клонларининг ПЗР таҳлил натижаси.



5-расм. GFP рекомбинант клонларининг визуализацияси. GFP рекомбинант оксилни экспрессиялайдиган хужайралар (яшил ранг, 20 х катталаштирилган).

Мана шу асосда бажарилган ишларнинг натижасида *Pichia pastoris* рекомбинант клонларининг селекцияси амалга оширилиб, ўзида керакли оксиллар экспрессия кассеталарини сакловчи GS115 *Pichia pastoris* pPIC3.5-PreS2-S, pPIC9-PreS2-S, pPIC3.5-GFP ва pPIC9-GFP рекомбинант клонлари саралаб олинди.

***Pichia pastoris* рекомбинант штамmlарини кўпайтиришнинг оптимал шарт-шароитларини аниқлаш.**

Маълумки олинаётган рекомбинант оксилларнинг миқдори штамм-продуцентларни технологик усулда кўпайтириш жараёнига узвий боғлиқ бўлиб, мақбул шароитларни танлаш асосида юкори унум билан тегишли оксил синтезига эришиш мумкин. Юкорида таъкидлаб ўтилганидек, *Pichia pastoris* метанолни утилизация қилиш ижобий (Mut^+) фенотипи метанолда ёввойи типдаги штамmlар каби тез ўсади, бунда pPIC3.5-PreS2-S ва pPIC9-PreS2-S экспрессия даражалари деярли фарқ қилмайди. Шу сабабли тадқиқотимизда Mut^+ фенотипига мансуб *Pichia pastoris* рекомбинант штамmlарини ферментерда кўпайтириш (яримсаноат) жараёнини камраб олдик. Тажрибалар натижасида уч босқичли стратегия ишлаб чиқилди. Бунда, биринчи босқичда рекомбинант ачитки штамми махсус ботиқ қолбаларда 18-20 соат давомида кўпайтирилди (ферментерга юкланадиган умумий ҳажм миқдорининг 5% нисбатида). Иккинчи босқичда ферментерга ҳажмий нисбатларда 5 % глицерин ва 0.5% сорбитол тутувчи озук муҳити юкланди. Муҳитнинг pH кўрсаткичи 25% аммиак билан pH=5.0 га тўғирланди. Сўнгра ферментерга оптик зичлиги $OD_{600}=5.0$ гача ўстирилган хужайра культураси солинди. Ферментернинг айланиш тезлиги 600 ай/мин, эриган кислороднинг миқдори (DO) эса 25% дан кам бўлмаслиги таъминланди. Кейинги босқичнинг аввалида (ферментерда инкубация бошлангандан 10 соат ўтгандан сўнг) муҳитга таркибиде 12 мл/л РТМ1 сакловчи 100 % метанолдан 3.5 мл/л/соат миқдорда (0.1% -0.5%) 4 соат мобайнида кўшилди. Сўнгра мазкур миқдор метанолнинг концентрацияси 1% га етгунча кўтарилиб, 50 соат давом эттирилди. Ушбу босқичда ҳўл хужайра биомассаси 420-430 г/л ни ташкил этди. Аналогик усулда рекомбинант S оксилни экспрессияловчи штаммда ҳам тажриба ўтказилиб худди шундай натижага, яъни озук муҳитидаги хужайра

биомассаси - 420-430 г/л га эришилди. Кўпайтириш жараёнида 10 л ҳажмли ферментерда HBV вакцинасининг 10 000 доза миқдорига тенг (~10 мг/л) бўлган субстанция синтезига эришилди. Бунда *Pichia pastoris* рекомбинант штаммларини кўпайтиришга кетган жами вақт бошлангич этапни ҳам ҳисобга олганда 90-92 соатни ташкил этди. Бу муддат илмий адабиётларда келтирилган ўртача вақт (120 соат) билан солиштирилганда деярли 30% га қисқа эканлиги маълум бўлади.

***Pichia pastoris* ачитқи хужайраларидан тегишли рекомбинант оқсилларни ажратиб олиш ва тозалаш.**

Pichia pastoris ачитқи хужайраларидан тегишли рекомбинант оқсилларни ажратиб олиш учун биринчи навбатда хужайраларни гомогенизациялаш шароитлари ўрганилди. Бунда энг мақбул паройт хужайра биомассасини шиша шарчалар (dm 0.5 mm, 1:1 нисбатда) ёрдамида, 1500 айл/мин ва 15-20 мин давомида (тегирмонда) гомогенизациялаш, ёки бўлмасам юқори босимли гомогенизаторда 1200-1250 бар босим остида хужайраларга ишлов бериш эканлиги аниқланди. Кейинги босқичда ажратиб олинган хужайра гомогенатини аммоний сульфат тузининг турли хил концентрацияси билан тўйинтириш орқали чўктириш амалга оширилди. Тажриба натижалари ачитқи хужайраларидан рекомбинант PreS2-S ва S оқсиллини сақловчи фракцияларни ажратиш учун хужайра гомогенатини 25% ва 75% ли аммоний сульфат билан босқичли чўктириш энг самарали эканлигини кўрсатди (2-жадвал, 6-расм).

Кейинга босқичда рекомбинант оқсилларни сақловчи фракциялар (аммоний сульфат тузи билан 75% тўйинтириб олинган чўкмалар) сефадекс G-25 (HiPrep 26/10 Desalting, 0.3 МПа, 11 мл/дақ) сорбентида гелъ филтрация ёки диализ усули ёрдамида тузсизлантирилди. Тузсизлантирилган намуналар лиофил қуритгичда (Christ Alpha 1-2 Ldplus) қуритилди ва PBS (150 mM NaCl, 5.2 mM Na₂HPO₄, 1.7 mM KH₂PO₄, pH 7.8) эритмасида эритилди. Намуналарнинг электрофореграммаси оқсил фракциялари юқори ва паст молекуляр баласт оқсиллар тутишини кўрсатди (6-расм, Б). Шу сабабли юқори молекуляр оқсиллардан қутилиш мақсадида биз Sephadex G-200 сорбентидаги гелъ-хроматографиядан фойдаландик. Тажрибалар мобайнида рекомбинант S оқсиллини сақловчи намуналар мисолида гелъ-филтрация жараёнининг энг оптимал шароити - оқим тезлиги 2.6 мл/дақ, босим 0.34 МПа, элюант PBS (pH 7.8) бўлгани энг мақбул эканлиги аниқланди. Ажратилган фракциялар ИФА таҳлили натижаларига кўра саралаб олинди (7-расм).

2-жадвал

Фракциялардаги оқсиллар миқдори ва ИФА натижалари

Аммоний сульфат (%)	Намуна	Умумий оқсил миқдори (%)		ИФА тест натижалари (OD – 450 нм)	
		PreS2-S	S	PreS2-S	S
25	супернатант	94.8%	95.2%	1.510	1.489
	чўкма	5.2%	4.8%	0.212	0.201
75	супернатант	66.8%	67.6%	0.320	0.318
	чўкма	33.2%	32.4%	2.890	2.875
Мусбат назорат (HBV одам кон зардоби)				≥ 3000	
Манфий назорат (соғлом одам кон зардоби)				0.093	



6-расм. *Pichia pastoris* ачитки ҳужайралари гомогенати (А) ва 75% аммоний сульфатда чуқутирилган фракцияларнинг (Б) ПААГ электрофорези.



7-расм. Реконбинант S оксидлини сақловчи фракцияни гель-фильтрация жараёнининг хроматограммаси.

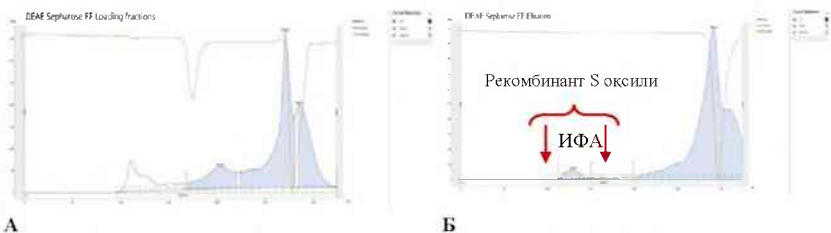
7-расмдан кўриниб турганидек, Sephadex G-200 SF ёрдамидаги гель-фильтрация боскичида молекуляр массаси юқори бўлган балласт оксидларнинг бир қисмидан қутилишга эришилди ва керакли реконбинант оксид сақловчи фракциялар ажратиб олинди. Олинган намуналарнинг 10% ПААГ электрофорез ёрдамидаги таҳлили 15-60 кДа оралиғидаги 8 хил оксидларни камраб олишини кўрсатди (8-расм).



8-расм. S оксидлини сақловчи фракцияларнинг ПААГ электрофорези.

Таҳлил натижалари керакли рскомбинант оксидларни тоза ҳолда ажратиб олиш учун бошқа турдаги хроматография усулларидадан фойдаланиш зарурлигини кўрсатди.

Ушбу мақсадда керакли реконбинант оксидли сақловчи фракцияларни HiScale 50/20 колонкасида DEAE Sepharose FF ёрдамидаги ион-алмашиниш хроматографияси усули билан тозалаш амалга оширилди. Икки босқичли жараённинг оптимал шароитлари аниқланди: 1-босқич - намуна буфер I (50мМ Трис-НСl рН 8.5, кондуктивлиги ~ 3.2 мS/см) билан мувофиқлаштирилган колонкага юқланди ва балласт оксидлар колонкадан ювиб чиқарилди (оқим тезлиги 3.5 мл/мин, OD=280 нм да детекция). ИФА таҳлилга кўра бу босқичда ажратилган оксидлар фракцияси таркибида керакли реконбинант оксидлар аниқланмади (9-расм. А). 2-босқич керакли оксидли буфер II (50мМ Трис-НСl рН 8.5, 500 мМ NaCl, кондуктивлиги ~ 50мS/см, оқим тезлиги 3.5 мл/мин) ёрдамида элюирлаб олиш. ИФА таҳлили асосида керакли S оксидлини сақловчи фракциялар бирлаштирилди (9-расм. Б).



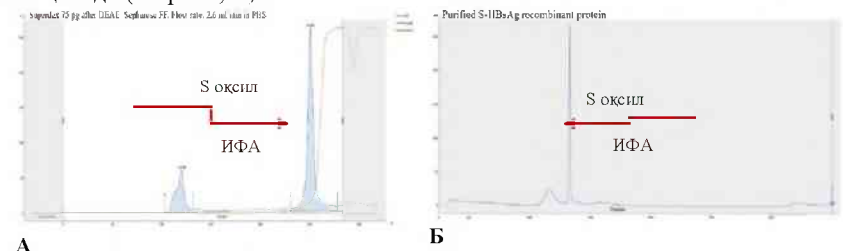
9-расм. DEAE Sepharose FF ёрдамидаги КХ. А. 1-босқич. Б. 2-босқич.

DEAE Sepharose хроматографиядан сўнг олинган рекомбинант оксид сақловчи фракциялар ПААГ электрофорез таҳлилига кўра 15-45 кДа оралиғидаги 4 та оксид компоненти сақлашни кўрсатди (10-расм).



10-расм. Рекомбинант S оксидини сақловчи фракцияларнинг DEAE Sepharose FF хроматографиядан сўнг 10% ПААГ электрофорез таҳлили.

Шу муносабат билан керакли оксидни ($MW=24$ кДа) тозалаш учун кейинги босқичда молекуляр массаси 3 - 70 кДа оралиғидаги оксидларни ажратишга имкон берувчи Sephadex G 75 pg (HiLoad 26/600) фойдаландик. Тажрибалар натижасида PBS буфери (pH 7.8) билан 2.6 мл/дақ оқим тезлигидаги (0.34 МПа) элюция энг мақбул эканлиги аниқланди (11-расм, А). Якуний босқичда йиғилган фракциялар бирлаштирилиб, юқорида келтирилган шароитлар остида рехроматография қилинганда уларнинг гомоген эканлиги аниқланди (11-расм, Б).



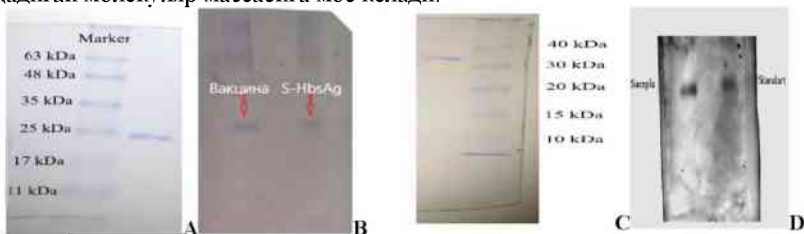
11-расм. Sephadex G 75 (HiLoad 26/600) КХ жараёнининг хроматограммаси.

Олинган натижалар асосида рекомбинант S оксидини *Pichia pastoris* ачитки хужайрларидан тоза ҳолда ажратиб олиш бўйича лаборатория регламенти тузилди.

Олинган рекомбинант оксидларни ПААГ электрофорез, ИФА ва иммуноблот усуллари ёрдамида тавсифлаш.

Ачитки хужайраларидан жратиб олинган PreS2-S ва S рекомбинант оксидларни тавсифлаш учун қуйидаги усуллардан фойдаланилди: 10% полиакриламиддаги гел-электрофорез (12-расм), иммуноблотинг ва иммунофермент таҳлили (3-жадвал). ПААГ электрофорез натижасига кўра

тоза холдаги рекомбинант S оксилнинг молекуляр оғирлиги 24 кДа (12-расм, А), PreS2-S оксилнинг массаси эса 34 кДа ни (12-расм, С) ташкил этиб, тегишли геллар кодлайдиган аминокислота кетма-кетлигидан келиб чикадиган молекуляр массасига мос келади.



12-расм. Тозаланган рекомбинант S ва PreS2-S оксилларнинг 10% ПААГ электрофорез ва и иммуноблот таҳлили натижаси.

Олинган рекомбинант оксилларнинг ИФА таҳлили натижалари *Pichia pastoris* ачиткисидан ажратиб олинган рекомбинант S ва PreS2-S оксиллари тижорат вакциналари билан қиёсланганда юқори антиген спецификлик намоён этишини кўрсатди (3-жадвал).

3-жадвал

Рекомбинант S ва PreS2-S оксилларининг қиёсий ИФА таҳлили		
Намуна	ИФА (OD 450 нм)	Оксилнинг умумий миқдори, мг/мл
Нормал <i>Pichia pastoris</i> ачитки ҳужайрасидан ажратилган умумий оксил	0.050	21.3×10^{-3}
«Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India»	2.425 (1:2000)	21.3×10^{-3}
<i>Pichia pastoris</i> ачиткисидан ажратиб олинган рекомбинант S оксиди	2.875 (1:2000)	21.7×10^{-3}
<i>Pichia pastoris</i> ачиткисидан ажратиб олинган рекомбинант PreS2-S оксиди	2.925 (1:2000)	21.7×10^{-3}

Олинган рекомбинант оксилларнинг антигенлик хусусиятлари иммуноблот таҳлиллари ёрдамида тасдиқланди (12-расм, В, D).

Рекомбинант S ва PreS2-S оксилларининг иммуногенлигини ўрганиш. Иммунологик самарадорлик биз томондан олинган рекомбинант S ва PreS2-S оксилларига нисбатан ишлаб чиқариладиган антитаналар миқдорига нисбатан амалга оширилди. Қиёслаш препарати сифатида «Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India» тижорат вакцинаси ишлатилди (4-жадвал).

4-жадвал

ИФА усули ёрдамида рекомбинант S ва PreS2-S оксилларининг иммунологик самарадорлигини қиёсий баҳолаш.

Ҳайвонлар гуруҳи	ИФА (OD - 450 нм)	
Рекомбинант S оксиди билан иммунизацияланган сичқонлар (1-гуруҳ)	1	1.810
	2	2.045
	3	2.156
	4	1.870
	5	2.010
Рекомбинант PreS2-S оксиди билан	1	1.833

иммунизацияланган сичқонлар (2-гурух)	2	2.310
	3	2.566
	4	1.970
	5	2.056
Тижорат вакцинаси билан иммунизацияланган сичқонлар (3-гурух)	1	1.837
	2	1.649
	3	2.060
	4	1.680
	5	2.130
Рекомбинант оқсил сақламайдиган <i>Pichia pastoris</i> ачитқи лизати билан иммунизацияланган сичқонлар (4-гурух)	1	0.220
	2	0.262
	3	0.214
	4	0.250
	5	0.198

Ушбу жадвалдан кўриниб турибдики, *Pichia pastoris* ачитқи хужайраларида экспрессияланган рекомбинант S ва PreS2-S оқсиллари тижорат вакцинаси билан такқосланганда юкори иммуноген фаоллик намоён этади.

Рекомбинант оқсилларни *Bombux mori* бакуловирус/хашарот экспрессия тизимида олиш. MIS -Мюллер ингибирловчи сўбстанцияси рекомбинант оқсиллини кодловчи рекомбинант плазмидида клонлаштириш.

Маълумки, хашарот хужайра культураларида рекомбинант оқсилларни синтезлаш жараёни бирмунча мураккаб ва серҳаражат ҳисобланади. Шу сабабли рекомбинант MIS оқсиллини биотехнологик усулда олишни арзонлаштириш мақсадида *Bombux mori* тут ипак курти личинкаларидан фойдаланиш мақсад қилинди. Бунинг учун MIS генини сақловчи рекомбинант pBacPAK8-polh-MIS плазмидида, унинг асосида эса ипак курти личинкаларида ушбу оқсилни экспрессиялайдиган рекомбинант бакуловирус олдик. MIS гени *Autographa californica* хашарот вирусига мўлжалланган pBs-Ac-polh-MIS плазмид ДНКдан EcoRI рестриктаза ферменти билан ишлов берип натижасида “кесиб олинди”. *Bombux mori* бакуловирусига клонлаш учун мўлжалланган pBacPAK8 векторига ҳам комплементарликни таъминлаш мақсадида ушбу рестриктаза билан ишлов берилди ва ёпишқоқ учлар ҳосил қилинди (14-расм).



14-расм. pBacPAK8 трансфер вектори (А) ва pBs-Ac-polh-MIS плазмидаси (В,С)/EcoRI



15-расм. pBacPAK8-polh-MIS плазмидасини (С) EcoRI рестриктазаси билан гидролиз

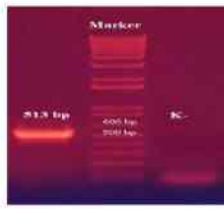
14-расмдан кўриниб турибдики, рестрикция натижасида pBacPAK8 трансфер векторининг (5538 н.ж.) чизиқли, pBs-Ac-polh-MIS плазмидасининг икки хил ўлчамли ДНК фрагментлари pBs-Ac-polh (3651 ж.н., В) ва MIS гени ДНК фрагменти (2058 ж.н., С) ҳосил бўлади. Керакли фрагментлар гелдан

электроолюция усули ёрдамида ажратиб олинган, кесилган учлари ўз-ўзига “ёпишиб” қолмаслиги учун ишкорий фосфатаза ферменти билан ишлов берилди ва Т4 ДНК лигаза ферменти ёрдамида 1:10 (вектор ва ген) нисбатда лигирланди. Лигирлашдан сўнг олинган аралашма *Escherichia coli* NEB-5 α электрокомпетент хужайраларига трансформация қилинди. Клонлаштирилган рВасРАК8-MIS рекомбинант плазмидаси ампициллинга чидамли ген тутади ва шунинг учун ампициллинли озуқа муҳитида фақат рекомбинант плазмида тутувчи *Escherichia coli* хужайратари ўсади. Ампициллинли озуқа муҳитида ўсиб чиққан трансформантлар билан рестриксион ва ПЗР таҳлил амалга оширилди. Бунинг учун рВасРАК8-polh-MIS плазмидасига EcoRI рестриктазаси билан ишлов берилди. Натижада ҳосил бўлган ДНК фрагментлари қутилган ўлчамга мос келиши аниқланди (15-расм).

Рекомбинант клонларнинг ПЗР таҳлилини амалга ошириш учун MIS генининг таркибий қисмларига қуйидаги праймерлар дизайни ва синтези амалга оширилди: MIS-1F ATGCGGGACCTGCCTCTCACCA; MIS-2R AGGCTCTGGGCACCCGGCAG (амплификат ўлчами 538 н.ж.); MIS-3F CTGCCGGGTGCCAGAGCCT; MIS-3R TCCGACAGGTTGACTAGGCCCT (амплификат ўлчами 433 н.ж.); MIS-4F AGGGCCTAGTCAACSTGTCCGA; MIS-4R TCTCGGGGATGAGTACGGAGCGCT (амплификат ўлчами 459 н.ж.); MIS-5F AGGGCCTAGTCAACSTGTCCGA; MIS-4R TCACCGGCAGCCACACTCGG (амплификат ўлчами 759 н.ж.). 16-расмдан кўриниб турганидек рВасРАК8-polh-MIS плазмидасининг ПЗР таҳлил натижасида MIS генининг таркибий қисмларига мос келувчи қутилган ўлчамдаги ДНК қисмлари ҳосил бўлади. Мана шу асосда рВасРАК8-polh-MIS плазмидасига тўлиқ ўлчамли MIS гени клонланганлиги аниқланди.



16-расм. Клонланган рекомбинант рВасРАК8-polh-MIS плазмидасининг ПЗР таҳлили



17-расм. MIS гени тўғри йўналишдаги ПЗР таҳлили

Рекомбинант рВасРАК8-polh-MIS плазмида таркибида MIS гени кДНКси тўғри йўналишда клонланганини аниқлаш мақсадида қуйидаги тузилишга эга праймерлар синтез қилинди: F-5'-TTGTAAAAATAACAGCCATT-3' (Polh промотр ДНК кетма-кетлиги); R-5'-TCTAAGCGCCTATGAGCA-3' (MIS генининг маълум қисмига). ПЗР натижасида ҳосил бўлган 513 н.ж. ўлчамли ДНК фрагменти қутилган мос келади (17-расм). Мана шу асосда MIS гени рВасРАК8-polh-MIS плазмидасига тўғри йўналишда, *polh* гени промотори остида клонланганлигини таъкидлаш мумкин. Таъдиқот доирасида рекомбинант рВасРАК8-polh-MIS плазмидаси таркибидаги MIS генининг нуклеин кислоталар кетма-кетлиги аниқланди ва одам ДНКси MIS генига мос

келиши аниқланди. Тегишли нуклеотидлар кетма кетлиги NCBI (АҚШ Миллий биотехнология ахборот маркази, GenBankID 2480761) халқаро маълумотлар базасида рўйхатдан ўтказилди.

Рекомбинант MIS оксилни экспрессиялайдиган рекомбинант бакуловирус олиш.

Рекомбинант MIS оксилни экспрессиялайдиган рекомбинант бакуловирус олиш учун керакли ген сақловчи pBacPAK8-polh-MIS плазмид ДНК ва ёввойи типдаги *Bombyx mori* (*BmNPV*) ядровий полиэдроз вируси геном ДНКси орасидаги гомологик рекомбинация Metafectene липосомал реагенти ёрдамида *Bombyx mori* BMN1 хужайраларида ко-трансфекциялаш орқали амалга оширилди. Рекомбинант бакуловирус клонларини ёввойи типдаги бакуловируслардан тозалаш учун Plaque assay, вирус клонларининг генетик бир хиллигига эришиш учун эса TCID50 усулидан фойдаланилди. Натижада керакли гени экспрессияловчи энг кўп миқдордаги вирус сақловчи колониялар саралаб олинди. Амалга оширилган ишлар натижасида рекомбинант бакуловирус концентрацияси 1 мл озуқа муҳитида $C=2 \times 10^6$ нусхага тенг бўлган миқдордаги вирус стоки олишга эришилди.

Энг кўп миқдорда рекомбинант оксил синтез қиладиган ипак қурти зотини аниқлаш.

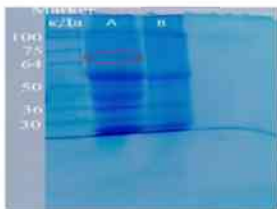
Тайёрланган вирус стоки билан *Bombyx mori* тут ипак қурти личинкалари инфицирланди. Бунинг учун Ўзбекистонда кенг тарқалган 4 та зотга мансуб тут ипак қурти личинкалари - “Марварид” (1), “Орзу” (2), “Гўзал” (3) ва “Юлдуз” (4) дан фойдаланилди. Инфицирлашнинг учинчи кунидан бошлаб, ҳар куни, личинкаларда синтезланаётган MIS оксилнинг миқдори ИФА усули ёрдамида таҳлил қилинди (5-жадвал). 5-жадвалдан кўриниб турибдики, рекомбинант MIS оксиди энг кўп миқдорда инфицирлашдан сўнг 5-кун “Марварид” зотига мансуб тут ипак қурти личинкаларида синтезланади.

5-жадвал

MIS оксилнинг иммуофермент таҳлил натижалари

Кун	ИФА натижалари (OD-450 нм)						
	Тут ипак қурти зотлари						
	Марварид	Орзу	Гўзал	Юлдуз	Ижобий намуна	Салбий намуна	Инфицирлан маган курт
3	0.794	0.453	0.682	0.547	3.000	0.097	0.082
4	1.992	1.562	1.702	1.532			
5	>>3.000	2.422	2.897	2.584			

Олинган рекомбинант MIS оксилни тавсифлаш учун ПААГ электрофорез ва иммуоблотинг усулларида фойдаланилди. Бунинг учун танлаб олинган *Bombyx mori* личинкалари 0.4% SDS, 2.4 mM EDTA, 2 mM PMSF таркибли 0.1M Трис буфери (pH 7.8) ёрдамида 1:5 нисбатда (1 г биомасса:5 мл буфер) 4 соат давомида экстракцияланди ва ультратовуш (22 кГц) билан ишлов берилди. Шундан сўнг гомогенат центрифугаланиб, супернатант ажратиб олинди ва керакли оксил фракцияси аммоний сульфат ёрдамида 45% тўйинтириш йўли билан чўктириб олинди.



18-расм. Рекombинант MIS оксилининг 19-расм. Тут ипак курти 10% ПААГ тахлили. А) MIS сакловчи тут личинкаларида олинган рекombинант ипак курти гомогенати. В) MIS оксилининг иммуноблот Инфицирланмаган ипак курти гомогенати тахлили.

Олинган фракциялар ПААГ электрофорез ёрдамида тахлил қилинди ва тахлил натижасига кўра рекombинант MIS оксиди мономерининг молекуляр оғирлиги 70 кДа ни ташкил этиб, унинг аминокислота кетма-кетлигидан келиб чиқадиган молекуляр массасига мос келиши аниқланди (18-расм). Иммуноблот тахлили тут ипак куртларида синтезланган рекombинант MIS оксиди одам MIS оксиди моноклонал антитаналарига нисбатан антиген спецификлик намоён этишини кўрсатди (19-расм).

Мана шу асосда, *Bombyx mori* личинкаларида синтезланган рекombинант MIS оксилининг молекуляр оғирлиги 70 кДа (мономер) эканлиги ва натив оксидга хос бўлган антиген спецификлик намоён этиши аниқланди.

Антибиотикларга чидамли микроорганизм штамmlарини олиш ва модаларнинг биологик фаоллигини скрининги.

Диссертация иши доирасида *in vitro* антимиқроб фаоллиқни ўрганиш мақсадида маълум антибиотикларга чидамли мульти резистент *Escherichia coli* бактерияси ва *Pichia pastoris* ачитки штамmlари олинди. *Escherichia coli* бактериясининг ампициллин, карбенициллин, неомицин, канамицин ва генетицинга (G418, гентамицин В1) чидамли штаммини олиш мақсадида pCDNA3.1 (5428 н.ж.) трансфер вектори танлаб олинди. Ушбу вектор мультирезистентлик хусусиятига эга бўлиб қуйидаги генларни ўз ичига олади: - «Ген AmpR», ўлчами 861 н.ж., бета-лактамазани кодлайди. Ушбу бета-лактамаза ампициллин, карбенициллин ва бошқа бета-лактама ҳалқасини тутувчи бирикмаларни парчалайди. «Ген Neo/KanR», ўлчами 975 н.ж., аминогликозид фосфотрансферазани кодлайди. Ушбу фермент аминогликозидлар қаторига кирувчи бир неча турдаги антибиотикларни, жумладан канамицин, неомицин, гентамицин В1 ва б. парчалайди. Антибиотикларга чидамли *Pichia pastoris* ачитки штаммини олиш мақсадида эса pPICZαA трансфер вектори танлаб олинди. Ушбу трансфер вектор Зеоцинга (Флеомицин D1, гликопептидли антибиотик) резистентликни намоён этиб, 375 н.ж. ўлчами «BleoR» генини сақлайди. У кодлайдиган оксид блеомицин қаторига кирувчи антибиотикларни парчалайди.

pCDNA3.1 вектори *Escherichia coli* *Neb-5a* хужайраларига ва pPICZαA трансфер вектори *Pichia pastoris* ачитки хужайраларига электропорация усули ёрдамида киритилди. Трансформация жараёнидан сўнг хосил бўлган колониялар санаб ўтилган алоҳида антибиотиклар ёки бўлмасам уларнинг комбинациясини

тутувчи озука муҳитларида ўстирилди ва шу орқали рекомбинант колониялар саралаб олинди. Мана шу асосда юқорида келтирилган антибиотиклар қаторига мансуб препаратларга чидамли микроорганизм штаммлари олинди.

Табиий ва синтетик табиатга эга моддаларнинг антибактериал ҳамда замбуруғларга қарши фаоллигини текшириш.

Тадқиқот иши доирасида табиий ва синтетик келиб чиқишга эга жами 350 дан ортиқ намунанинг антибактериал ва замбуруғларга қарши *in vitro* скрининги амалга оширилди. Ушбу намуналар жумласига халқ табобатида турли хил юкумли касалликларни даволашда қўлланиладиган 90 дан ортиқ ўсимликдан ажратиб олинган экстрактлар, эфир мойлари, индивидуал моддалар ва уларнинг синтетик ҳосилалари киради. Антибактериал ва замбуруғларга қарши *in vitro* скрининг натижалари ўрганилган ўсимлик объектлари орасидан *Cnicus sp.* ва *Potentilla asiatica* спиртли экстрактлари энг кучли ифодаланган антибактериал фаоллик, шу жумладан ампициллин ва канамицинга резистент бактерия штаммларига нисбатан ҳам намоён этишини кўрсатди (6-жадвал). Тадқиқ қилинган экстрактлар таркибидан микробларга қарши фаоллиги бўлган индивидуал компонентларни аниқлашга қаратилган кейинги тадқиқотлар самарали дори воситаларини яратишга имкон беради.

6-жадвал

Моддаларнинг антибактериал ва замбуруғларга қарши фаоллиги (агардаги диск диффузия усули)

na* - фаол эмас; nt – текширилмаган

Намуна	Ингибирлаш диаметри (mm, ± SD, P<0.05)						
	Грам-мусбат бактерия		Грам-манфий бактерия			Замбуруғ	Ачтиқ и
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli Resist+</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. pastoris Resist+</i>
<i>Cnicus sp.</i>	26.04±0.10	25.04±0.10	22.08±0.12	21.08±0.12	22.08±0.12	na	na
<i>Potentilla asiatica</i>	20.04±0.10	18.08±0.12	16.08±0.12	16.08±0.12	12.08±0.12	na	na
1,11-бис... ундекан	22.04±0.10	15.04±0.10	16.08±0.12	16.08±0.12	16.08±0.12	24.04±0.10	12.08±0.12
Ампициллин	27.08±0.12	26.04±0.10	26.08±0.12	na*	nt	nt	nt
Цефтриаксон	nt	nt*	26.12±0.13	na	26.08±0.12	nt	nt
Флюканазол	nt	nt	nt		nt	28.04±0.10	nt

Синтетик бирикмалар орасидан - 1,11-бис- (6,7-диметокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-1-ил) ундекан *Candida albicans* замбуруғ штаммига нисбатан энг юқори фаоллик намоён этиши аниқланди (6-жадвал). Ушбу моддага ЎЗР ихтирога патенти (UZ №IAP 05940) олинди, ундан замбуруғларга қарши янги дори воситасини яратишда асос сифатида фойдаланиш имконияти кўрсатиб берилди.

ХУЛОСАЛАР

1. Илк бор Гепатит В вируси (HBV) юза антигенини PreS2-S (865 н.ж.) *Pichia pastoris* ачтиқларида кодловчи pPIC3.5-PreS2-S ва pPIC9- PreS2-S рекомбинант плазмидалари клонлаштирилган. Клонлаштирилган рекомбинант «PreS2-S» ДНК

фрагментининг нуклеотид кетма-кетлиги аниқланиб, HBV D генотипига мос эканлиги аниқланган.

2. Клонлаштирилган рекомбинант плазмидалар асосида PreS2-S оксилни экспрессияловчи янги рекомбинант *Pichia pastoris* ачитки штаммлари олинган. Ачитки хужайраларидаги рекомбинант PreS2-S оксилнинг экспрессияси ва антиген спецификлиги ПААГ (34 кДа) электрофорез, ИФА ва иммуноблот таҳлиллари натижасида тасдиқланган.

3. Илк бор *Pichia pastoris* рекомбинант pPIC9-PreS2-S ва pPIC9-S штаммларини кўлайтиришнинг технологик (озука муҳитининг таркиби, вақт, pH, DO, ҳарорат режими), яъни энг кўп миқдорда хужайра биомассаси (420-430 г/л), PreS2-S ва S оксилларини ўртача ≈ 10 мг/л (1000 вакцина дозаси/л) миқдорига тенг субстанция синтезига олиб келадиган шарт-шароитлари аниқланган.

4. Илк бор *Pichia pastoris* ачитки хужайраларидан рекомбинант PreS2-S ва S оксилларини ажратиб олиш, тозалаш ва стандартлаш усуллари ишлаб чиқилган - ачитки хужайраларини гомогенизациялашнинг, аммоний сульфат тузи билан босқичли чўктиришнинг, Sephadex G-200 SF, DEAE Sepharose FF ва Supredex 75pg сорбентларидаги босқичли хроматография жараёнларининг энг мақбул шароитлари аниқланган.

5. Рекомбинант оксилларнинг тижорат вакциналари (Hepatitis-B Vaccine (rDNA), Serum Institute of India; Euvax B, Sanofi Pasteur Korea Ltd) билан қиёсий *in vivo* иммуногенлик таҳлиллари рекомбинант PreS2-S ва S оксиллари аналогик иммун жавоб намоён этишини кўрсатган.

6. Илк бор тут ипак қурти *Bombyx mori* хужайраларида MIS (Мюллер ингибирловчи субстанцияси) оксилни кодлайдиган рекомбинант pVasPAK-8-PoH-MIS плазмидаси клонлаштирилган. MIS гени ДНК фрагментининг нуклеотид кетма-кетлиги ўрганилиб, одам MIS геномига мос эканлиги аниқланган.

7. ПААГ электрофорез ва иммуноблотнинг таҳлиллари асосида олинган рекомбинант MIS оксили одам MIS окселига тегишли бўлган молекуляр оғирлик 70 кДа (мономер) ва антигенлик хусусиятларини намоён этиши аниқланган.

8. Ўзбекистонда кенг тарқалган 4 та *Bombyx mori* тут ипак қурти маҳаллий зотларини қиёсий таҳлил қилиш асосида, *in vivo* энг кўп миқдорда тўғри пост-трансляцион модификацияга эга рекомбинант оксил синтезловчи “Марварид” зоти аниқланиб, ушбу зотни биотехнологияда қўллаш имкониятлари кўрсатиб берилган.

9. Клонлаш ёрдамида *Escherichia coli* бактерияси ва *Pichia pastoris* ачиткиларининг ампициллин, карбенициллин, неомицин, канамицин, генетицин (гентамицин B1) ва зеоцин (флеомицин D1) антибиотикларига нисбатан резистент штаммлари антимикроб фаолликни текшириш мақсадида олинган.

10. Табиий ва синтетик келиб чиқишга эга жами 350 дан ортик намунанинг, жумладан халқ табобатида антимикроб восита сифатида ишлатиладиган Ўзбекистон флорасига мансуб 90 хилдан ортик ўсимликдан ажратиб олинган экстрактлар, эфир мойлари, индивидуал моддалар ва уларнинг синтетик ҳосилаларининг антибактериал ва замбуруғларга қарши *in vitro* скрининги амалга оширилган.

11. 1,11-бис-(6,7-диметокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-1-ил) ундекан *Candida albicans* замбуруғ штаммига, *Cnicus sp.*, *Potentilla asiatica* ўсимликларининг экстрактлари эса грам-мусбат ва грам-манфий бактерия штаммлари, шу жумладан ампициллин ва канамицинга резистент штаммларга нисбатан яққол ифодаланган антибактериал фаоллик намоён этиши аниқланган.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.02/30.12.2019.К/В.37.01 ПО
ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

САСМАКОВ СОБИРДЖАН АНАРМАТОВИЧ

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ КЛЕТОК ДЛЯ
ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ И ИССЛЕДОВАНИЯ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ**

02.00.10 – Биоорганическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ
ДОКТОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК (DSc)**

Ташкент – 2021

Тема диссертации доктора наук (DSc) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером B2021.4.DSc/B151

Диссертация выполнена в Институте химии растительных веществ.

Автореферат диссертации на трёх языках (русском, узбекском, английском (резюме)) размещен на веб-сайте Научного Совета (www.biochem.uz) и на Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» (www.ziynet.uz).

Научный консультант: Азимова Шахноз Садыковна
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: Ахунов Али Ахунович
доктор биологических наук, профессор
Далимова Сурайё Нигмановна
доктор биологических наук, профессор
Рахманбердиева Рано Каримовна
доктор химических наук


Ведущая организация: Ташкентский фармацевтический институт

Защита диссертации состоится «__» _____ 2021 г. в ____ часов на заседании Научного Совета DSc.02/30.12.2019.K/V.37.01 при Институте биоорганической химии (Адрес: 100125, Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83. Тел.: (+99871) 262-35-40, факс: (+99871) 262-70-63).

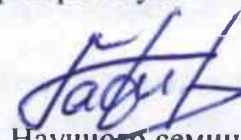
С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института биоорганической химии (регистрационный номер № _____). Адрес: 100125, Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83. Тел.: (+99871) 262-35-40, факс: (+99871) 262-70-63, e-mail: shsha@mail.ru.

Автореферат диссертации разослан: «__» _____ 2021 года.
(реестр протокола рассылки _____ от «__» _____ 2021 года).




Ш.И. Салихов
Председатель Научного Совета по присуждению
ученых степеней, д.б.н., академик


Ш.А. Шомуротов
Ученый секретарь Научного Совета по присуждению
ученых степеней, д.х.н.


М.Б. Гафуров
Председатель Научного семинара при Научном Совете
по присуждению ученых степеней, д.х.н., с.н.с.

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора наук (DSc))

Актуальность и востребованность темы диссертации. В настоящее время во всем мире вирусные заболевания, бактериальные инфекции и злокачественные опухоли являются одними из самых серьезных проблем здравоохранения. Возрастающая устойчивость патогенных микроорганизмов к существующим противомикробным препаратам также усугубляет данную ситуацию. Основная мера, направленная на профилактику вирусных заболеваний – это вакцинация препаратами, полученными биотехнологическими методами в различных клетках. Разработка современных препаратов, малотоксичных для здоровых тканей и органов человека, а также ранняя и точная диагностика является основным направлением в борьбе с раковыми заболеваниями. В частности, по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), сегодня более 296 миллионов человек во всем мире хронически инфицированы вирусом гепатита В (HBV), от которого ежегодно умирает более чем 1 миллион человек и выявляется около 1,5 миллиона новых случаев инфицирования. В связи с высоким спросом на вакцины HBV, а также учитывая необходимость создания новых эффективных вакцин, обеспечивающих наилучшую защиту от мутированных вариантов вируса задача получения новых рекомбинантных вакцин к HBV является актуальной. Ингибирующую субстанцию Мюллера (MIS), которая используется для диагностики репродуктивного состояния человека, а также рекомендованная для лечения рака яичников и молочной железы в настоящее время получают в СНО клетках с маленьким выходом, в связи с этим выбор оптимальной системы экспрессии, которая позволяет синтезировать физиологически активный белок, не отличающийся от своего природного аналога с высоким выходом является актуальной задачей.

В мире для достижения этих целей используется генетическая трансформация живых клеток с использованием технологий рекомбинантной ДНК - генная инженерия, включающая клонирование рекомбинантных ДНК и синтез необходимых белков на их основе, а также получение штаммов микроорганизмов, устойчивых к определенным антибиотикам для исследования антимикробных свойств веществ. При этом особое внимание уделяется разработке эффективных методов получения рекомбинантных белков в различных культурах клеток, проведение биологических исследований *in vitro* на штаммах рекомбинантных микроорганизмов.

В Республике достигнуты определенные научно-практические результаты в реализации инновационных разработок в области получения лекарственных средств и диагностикумов на основе рекомбинантных белков. В 4-ом направлении Стратегии действий развития Республики Узбекистан определены важные задачи по дальнейшему развитию фармацевтической промышленности, медицинских учреждений и улучшению обеспечения населения доступными качественными лекарственными средствами и

медицинскими изделиями¹. Исходя из этих задач, получение биологически активных рекомбинантных белков, выявление новых веществ с антибактериальной и противогрибковой активностями будут иметь важное значение в дальнейшем при создании эффективных лекарственных препаратов и диагностических средств.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в Постановлениях Президента Республики Узбекистан от 14 февраля 2018 года ПП-3532 «О дополнительных мерах по ускоренному развитию фармацевтической отрасли», от 6 мая 2019 года ПП-4310 «О мерах по дальнейшему развитию системы медицинского и фармацевтического образования и науки», а также в Указах Президента Республики Узбекистан УП-4947 «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан» от 7 февраля 2017 года, УП-5707 «О дальнейших мерах по ускоренному развитию фармацевтической отрасли Республики в 2019 - 2021 годах», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики Узбекистан. Диссертационное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологии Республики «Медицина и фармакология» - VI.

Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации².

Научные исследования направленные на получение биологически активных рекомбинантных белков для создания вакцин, лекарственных препаратов и диагностических средств с целью профилактики, лечения и диагностики различных инфекционных и социально значимых заболеваний, а также исследования, направленные на определение биологической активности природных соединений, выделенных из растительных источников и их синтетических производных с целью создания на их основе эффективных лекарственных препаратов осуществляются в ведущих научных центрах и высших образовательных учреждениях мира, в том числе в National Institutes of Health (США), National Center for Natural Product Research (США), Max-Planck-Instituts, Leibniz-Instituts, Helmholtz Centre for Infection Research (Германия), Medical University of Vienna (Австрия), Chinese Academy of Medical Sciences, Pekin Union Medical College (Китай), Институт Биоорганической химии РАН (Россия), а также в научно-технических лабораториях биофармацевтических компаний Pfizer Inc. (США), Roche (Швейцария), Sanofi (Франция), Gilead Sciences Inc. (США), Novartis (Швейцария), Jonson & Jonson (США), Merck & Co Inc. (США), Amgen Inc. (США), Serum Institute of India (Индия), Институт химии растительных веществ АН РУз, институт биоорганической химии АН РУз и др.

В результате научных исследований, проведенных в мировых ведущих центрах по получению рекомбинантных белков, а также антимикробной

¹ Указ Президента Республики Узбекистан УП-4947 от 7 февраля 2017 года «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан».

² Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации выполнен на основе <https://www.sciencedirect.com/>, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>, <https://scholar.google.com/> и др.

активности *in vitro* в культурах патогенных микроорганизмов, получен ряд научных результатов, в том числе: в *Pichia pastoris* получены более чем 70 рекомбинантных белков используемых в медицине, включая рекомбинантную вакцину против гепатита В, альфа-интерферон, рекомбинантный инсулин, а также рекомбинантный человеческий сывороточный альбумин, которые производятся с 1999, 2002 и 2003 годов, компаниями Shanta Biotech, Biocon и Mitsubishi Tanabe Pharma в больших количествах в промышленных масштабах. Одобренные ВОЗ рекомбинантные вакцины против вируса папилломы человека (ВПЧ), вызывающего рак шейки матки - CERVARIX®, против рака предстательной железы - PROVENGE® и вакцины от сезонного гриппа - FLUBLOK® получены в системе экспрессии бакуловирусы/клетки насекомых. В последние годы выявлен ряд природных соединений с антимикробной активностью, выделенные из растений - фенолы / полифенолы, терпеноиды, эфирные масла, алкалоиды, лектины и полипептиды, полиацетилены и др., на основе которых разрабатываются новые противомикробные лекарственные препараты.

В мире по получению рекомбинантных белков в системах экспрессии *Pichia pastoris* и *Bombux mori* бакуловирусы/клетки насекомых, по поиску антимикробных веществ проводится ряд исследований, в том числе в следующих приоритетных направлениях - клонирование новых рекомбинантных плазмид для систем экспрессии *Pichia pastoris* и бакуловирусы/клетки насекомых и получение на их основе высокопродуктивных штаммов-продуцентов, создание устойчивых к антибиотикам штаммов микроорганизмов и проведение *in vitro* скрининга веществ.

Степень изученности проблемы. В ряде ведущих зарубежных исследовательских центрах под руководством J.M. Cregg, H. Lünsdorf, A. Adnan, C.A. Guzmán, A. Vassileva, E.Y. Park, A.M. Ischenko, D.T. MacLaughlin и др. проводятся работы по получению и исследованию биологических свойств рекомбинантных белков, в частности поверхностных антигенов вируса гепатита В в дрожжевых системах экспрессии, таких как *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, а также рекомбинантного белка MIS в CHO клетках.

В нашей Республике, под руководством проф. Ш.С. Азимовой были проведены исследования по созданию генетических конструкций, позволяющих получить рекомбинантный белок PreS2-S HBV в личинках тутового шелкопряда (*Bombux mori*), по *in vitro* скринингу веществ на цитотоксическую активность, результаты которых, указывают на актуальность и значимость научно-практических работ в этом направлении.

Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами учреждения, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в рамках прикладных и фундаментальных проектов Института химии растительных веществ на темы ФА-Ф6-Т198 «Изучение влияния биологически активных веществ на метаболизм клеток» (2012-2016 гг.), КА-6-004 «Разработка способа получения рекомбинантного бакуловируса в

различных породах личинок *Bombyx mori*) (2015-2017 гг.), ВА-ФА-Ф-6-009 «Изучение цитотоксической, антибактериальной, противогрибковой и антиоксидантной активностей природных соединений и их синтетических производных» (2017-2020 гг.) и ПЗ-20170926277 «Разработка получения рекомбинантных белков в дрожжевой системе экспрессии *Pichia pastoris* с целью создания новых диагностических и лекарственных средств» (2018-2020 гг.).

Целью исследования является получение рекомбинантных белков PreS2-S, S и MIS - Ингибирующей субстанции Мюллера в дрожжах *Pichia pastoris* и в личинках тутового шелкопряда (*Bombyx mori*), создание штаммов микроорганизмов, резистентных к антибиотикам и определение антибактериальной и противогрибковой активности веществ.

Задачи исследования:

клонирование рекомбинантных плазмид pPIC3.5-PreS2-S и pPIC9-PreS2-S, кодирующих белок PreS2-S вируса гепатита В (HBV) в дрожжах *Pichia pastoris* и определение нуклеотидной последовательности клонированного фрагмента ДНК гена PreS2-S;

получение новых рекомбинантных штаммов дрожжей GS115 *Pichia pastoris*, экспрессирующих белок PreS2-S, на основе клонированных рекомбинантных плазмид;

определение уровня экспрессии и антигенных свойств рекомбинантного белка PreS2-S методами электрофореза в ПААГ, ИФА и иммуноблоттинга;

разработка технологических условий культивирования рекомбинантных штаммов *Pichia pastoris* pPIC9-PreS2-S и pPIC9-S;

разработка методов выделения и очистки целевых рекомбинантных белков из дрожжевых клеток *Pichia pastoris*;

изучение иммуногенных свойств полученных рекомбинантных белков *in vivo*;

клонирование рекомбинантной бакуловирусной плазмиды, кодирующей белок MIS – Ингибирующую субстанцию Мюллера. Определение нуклеотидной последовательности клонированного фрагмента ДНК MIS гена;

синтез рекомбинантного белка MIS в личинках тутового шелкопряда и выявление местных пород тутового шелкопряда, продуцирующих наибольшее количество белка;

характеристика полученного рекомбинантного белка MIS с помощью методов электрофореза в ПААГ и иммуноблоттинга;

клонирование штаммов микроорганизмов, устойчивых к определённым антибиотикам;

in vitro исследование антибактериальной и противогрибковой активности природных соединений и их синтетических производных.

Объектами исследования являются штамм дрожжей *Pichia pastoris*, культура клеток *Bombyx mori*, вирус ядерного полиэдроза *Bombyx mori* дикого типа, трансферные векторы pPIC3.5, pPIC9 и pVasPAK8, рекомбинантные белки PreS2-S, S и MIS, личинки тутового шелкопряда различных пород, плазмиды, содержащие гены устойчивости к антибиотикам,

грамположительные и грамотрицательные штаммы бактерий, *Candida albicans*, экстракты растений, индивидуальные соединения и их синтетические производные.

Предметом исследования являются экспрессия рекомбинантных белков PreS2-S и S в дрожжах *Pichia pastoris*, синтез рекомбинантного белка MIS в личинках различных пород *Bombyx mori*, хроматографические, гель-электрофоретические и антигенные свойства рекомбинантных белков, клонирование штаммов микроорганизмов, устойчивых к определенным антибиотикам, исследование антибактериальной и противогрибковой активности веществ.

Методы исследования. При выполнении работы использовали методы биоорганической химии, биохимии и биотехнологии (синтез олигонуклеотидов, секвенирование ДНК, клонирование генов, качественное и количественное определение белков, спектрофотометрия, хроматография, ИФА, иммуноблоттинг, биологические тесты *in vitro* и др.).

Научная новизна исследования:

впервые клонированы рекомбинантные плазмиды pPIC3.5-PreS2-S и pPIC9-PreS2-S, кодирующие поверхностный антиген PreS2-S (865 п.н.) вируса гепатита В (HBV) в дрожжах *Pichia pastoris*;

на основе клонированных плазмид получены новые рекомбинантные штаммы дрожжей GS115 *Pichia pastoris*, экспрессирующие белок PreS2-S;

впервые определены технологические условия культивирования рекомбинантных штаммов *Pichia pastoris* pPIC9-PreS2-S и pPIC9-S;

впервые разработаны методы выделения и очистки рекомбинантных белков PreS2-S и S из дрожжевых клеток *Pichia pastoris*;

впервые клонирована рекомбинантная плаزمида pVacPAK-8-Polh-MIS и на её основе получен рекомбинантный бакуловирус, кодирующий рекомбинантный белок MIS – Ингибирующую субстанцию Мюллера;

впервые осуществлен синтез рекомбинантного белка MIS в личинках тутового шелкопряда. Методом ПААГ электрофореза и иммуноблоттинга установлено, что рекомбинантный белок MIS имеет молекулярную массу 70 кДа (мономер) и проявляет антигенную специфичность, соответствующую белку MIS человека;

методом клонирования получены штаммы бактерий *Escherichia coli* и дрожжей *Pichia pastoris*, устойчивые к определенным антибиотикам;

проведен *in vitro* скрининг на антибактериальную и противогрибковую активность более чем 350 образцов природного и синтетического происхождения, включая экстракты, эфирные масла, индивидуальные вещества и их синтетические производные из более чем 90 видов растений флоры Узбекистана;

установлено, что 1,11-бис-(6,7-диметокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-1-ил) ундекан проявляет высокую активность в отношении патогенного грибка *Candida albicans*, экстракты растений *Cnicus sp.* и *Potentilla asiatica* проявляют выраженную активность против

грамположительных и грамотрицательных штаммов бактерий, включая штаммы, резистентные к ампициллину и канамицину.

Практические результаты исследования заключаются в следующем: в результате генетической трансформации дрожжей *Pichia pastoris*, бакуловируса/клеток *Bombyx mori* и бактериальных клеток для получения рекомбинантных белков и исследования биологической активности были получены поверхностные антигены PreS2-S и S вируса гепатита В, рекомбинантный белок MIS, а также устойчивые к антибиотикам штаммы бактерий.

разработаны методы клонирования рекомбинантных плазмид, кодирующих белки PreS2-S и S в дрожжах *Pichia pastoris*;

выявлено, что нуклеотидная последовательность клонированного фрагмента ДНК PreS2-S гена соответствует генотипу D вируса гепатита В, распространённому в Узбекистане, что является основой для получения субстанции вакцины к HBV, отличающейся от известных вакцин наличием 2 дополнительных антигенных детерминант;

разработаны технологические условия культивирования рекомбинантных штаммов pPIC9-PreS2-S и pPIC9-S *Pichia pastoris* (состав питательной среды, время, pH, DO, температурный режим), позволяющие получить наибольшее количество биомассы клеток (420-430 г/л), что приводит к синтезу рекомбинантных PreS2-S и S белков – субстанции для получения вакцин в количестве ≈ 10 мг/л (1000 доз субстанции вакцины/л);

разработаны методы выделения и очистки целевых рекомбинантных белков из клеток *Pichia pastoris*. Подобраны оптимальные условия гомогенизации, градиенты осаждения сульфатом аммония, хроматографии на сорбентах Sephadex G-200 SF, DEAE Sepharose FF и Supradex 75pg;

исследование иммуногенности на животных показали, что рекомбинантные белки S и PreS2-S демонстрируют высокий иммунный ответ; осуществлен синтез полноценного по функциональным свойствам рекомбинантного белка MIS в личинках тутового шелкопряда;

на основе сравнительного анализа уровня синтеза рекомбинантных белков выявлена местная порода тутового шелкопряда *Bombyx mori* «Марварид», продуцирующая наибольшее количество рекомбинантных белков с правильными пост-трансляционными модификациями и показана возможность использования этой породы в биотехнологии;

получены резистентные штаммы бактерий *Escherichia coli* и дрожжей *Pichia pastoris* к антибиотикам - ампициллину, карбенициллину, неомицину, канамицину, генетицину (гентамицин V1) и зеоцину (флеомицин D1).

на основе *in vitro* скрининга антибактериальных и противогрибковых свойств веществ природного и синтетического происхождения выявлены вещества с выраженной антимикробной активностью.

Достоверность результатов исследования обосновывается использованием современных методов биоорганической химии, биотехнологии, биохимии и молекулярной биологии. Научные результаты анализировали современными аналитическими и статистическими методами.

Подтверждением полученных результатов служат экспертные оценки специалистов, обсуждение результатов исследований на международных и республиканских научных конференциях, публикации результатов исследований в рецензируемых зарубежных научных изданиях и получение патентов.

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Научная значимость результатов исследования заключается в том, что впервые клонированы новые плазмиды, кодирующие рекомбинантные белки PreS2-S и S, поверхностных антигенов вируса гепатита В в дрожжах *Pichia pastoris*, впервые создан новый бакуловирус, экспрессирующий рекомбинантный белок MIS – Ингибирующую субстанцию Мюллера в личинках тутового шелкопряда *Bombyx mori*. Получены резистентные штаммы микроорганизмов к определенным антибиотикам на основе рекомбинантных плазмид. Исследованы антибактериальная и противогрибковая активность более чем 350 образцов, полученных из растений местной флоры, включая экстракты, эфирные масла, индивидуальные вещества и их синтетические производные. Результаты исследований могут быть использованы в учебных и научно-исследовательских работах в области биоорганической химии, биотехнологии, фармацевтики и фитохимии при изучении рекомбинантных белков, а также исследовании биологической активности природных соединений.

Практическая значимость результатов исследований заключается в том, что на основе клонированных рекомбинантных плазмид получены штамм-продуценты *Pichia pastoris*, экспрессирующие рекомбинантные белки PreS2-S и S, которые могут служить основой для создания новых эффективных вакцин или диагностических тест-систем на вирус гепатита В. Выявлена местная порода личинок шелкопряда «Марварид», продуцирующая наибольшее количество рекомбинантного белка и продемонстрирована возможность её использования в биотехнологии. В результате *in vitro* исследований были выявлены новые вещества с антибактериальной и противогрибковой активностью, которые могут служить основой для разработки новых лекарственных средств.

Внедрение результатов исследования. На основании научных результатов, полученных в результате исследований генетической трансформации клеток *Pichia pastoris*, *Bombyx mori*, а также бактерий для получения рекомбинантных белков и скрининга биологической активности:

получен патент на изобретение Агентства интеллектуальной собственности РУз (UZ №IAP 20160473) на породу личинок тутового шелкопряда (*Bombyx mori*), продуцирующей наибольшее количество рекомбинантного белка. В результате создается возможность использования личинок тутового шелкопряда местной породы в биотехнологической промышленности.

получен патент на изобретение Агентства интеллектуальной собственности РУз (UZ №IAP 05940, 2019 г.) на 1,11-бис-(6,7-диметокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-1-ил) ундекан, проявляющего

противогрибковые свойства. В результате создается возможность разработки и использования данного соединения в медицине в качестве противогрибкового средства.

последовательность нуклеотидов, кодирующая рекомбинантный белок PreS2-S зарегистрирована в международной базе данных NCBI GenBank ID MT023508 (National Center for Biotechnology Information, США, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT023508.1/>) и EMBL-EBI LR745788 (<https://www.ebi.ac.uk/>). В результате стало возможным использование данной информации для сравнительного анализа аналогичных белков на международном уровне.

последовательность гена, кодирующего рекомбинантный белок S зарегистрирован в международной базе данных NCBI GenBank ID MT023508 (National Center for Biotechnology Information, США, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MT023508.1/>) и EMBL-EBI LR745788 (<https://www.ebi.ac.uk/>). В результате создается возможность использования данной информации для определения местоположения антигенных детерминант, их сравнительного анализа.

последовательность нуклеотидов, кодирующая рекомбинантный белок MIS, включена в международную базу данных NCBI (National Center for Biotechnology Information, США) и зарегистрирована с идентификатором GenBank ID BankIt2480761 Seq3 MZ556958. В результате создается возможность использования данной информации для сравнительного анализа аналогичных белков в мировом масштабе.

получен паспорт на штамм дрожжей *Pichia pastoris*, синтезирующий рекомбинантный белок S, переданный в коллекцию промышленных микроорганизмов Института микробиологии АН РУз (коллекционный номер № СКБ-186 от 05.03.2020). В результате Республиканская коллекция микроорганизмов промышленного значения пополнилась новым штаммом-продуцентом.

в международном издании Springer (New York-Heidelberg-Dordrecht-London) опубликован II томный справочник на английском языке (1070 стр.): Handbook - "Natural Compounds: Plant Sources, Structure and Properties" 2013, Triterpene glycosides. V.5, Part 1. P.1-532 and Part 2. P.533-1070. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0541-2>, где систематизированы материалы по физико-химическим и биологическим свойствам природных соединений, в частности тритерпеновых гликозидов на основе мировой литературы. В результате создана возможность использования данной информации в мировом масштабе.

научные результаты по исследованию антибактериальной и противогрибковой активности соединений природного и синтетического происхождения были использованы в более 40 иностранных научных журналах с высоким импакт фактором: (Antibiotics, 2020, 9(8), 441, IF=4.639; Journal of Ethnopharmacology 2020, 250, 112466, IF=4.360; Toxins, 2019, 11(10), 598, JCR IF=4.54; Molecules, 2021, 26(11), 3193, IF=4.411; Frontiers in microbiology 2020, 11, 424, IF=5.640, Natural product research, 2021, 35(4), 696-

701, IF=2.158 и др.). Применение результатов скрининга на антибактериальную и противогрибковую активность позволило получить данные о биологически активных веществах и дало возможность провести направленные исследования химического состава растительных объектов.

Апробация результатов исследования. Результаты исследований по теме диссертации изложены в виде докладов и прошли апробацию на 43 научно-исследовательских конференциях и симпозиумах, в том числе на 15 международных и 28 республиканских.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано всего 89 научных работ, из них 2-х томный справочник в международном издании Springer, 2 патента РУз, 38 научных статей, в том числе 22 в международных и 16 в республиканских журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций, 3 заявки на патент.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов, списка использованной литературы и приложений. Объём диссертации составляет 200 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновываются актуальность и востребованность, цель и задачи исследования, обозначены объекты и предметы, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики, излагаются научная новизна и практические результаты исследования, раскрываются научная и практическая значимость полученных результатов, информация о внедрении результатов, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации «**Использование различных культур клеток в биотехнологии**» представлен обзор зарубежной научной литературы об получении биологически активных рекомбинантных белков с помощью биотехнологических методов, основанных на генетической трансформации живых клеток, технологиях рекомбинантной ДНК, включая экспрессию рекомбинантных белков в клетках дрожжей *Pichia pastoris* и бакуловирусах/клетках *Bombyx mori*. Также проанализирована информация по использованию различных штаммов микроорганизмов для *in vitro* тестов на антибактериальную и противогрибковую активность.

Вторая глава диссертации, озаглавленная «**Материалы и методы исследования**», описывает экспериментальную часть, в которой даны характеристики материалов и методик, использованных для получения рекомбинантных белков в системах экспрессии дрожжей *Pichia pastoris* и бакуловирусы / клетки насекомых *Bombyx mori*, а также для определения антибактериальной и противогрибковой активности.

Третья глава диссертации посвящена «**Получению рекомбинантных белков PreS2-S, S и GFP в дрожжах *Pichia pastoris***». В главе представлены результаты исследований по клонированию рекомбинантных плазмид, кодирующих поверхностные антигены вируса гепатита В – белков PreS2-S и

S, а также белка GFP в дрожжах *Pichia pastoris*. Результаты исследований по получению рекомбинантных штаммов *Pichia pastoris* на основе клонированных плазмид, по разработке технологических условий культивирования рекомбинантных штаммов, методов выделения и очистки полученных рекомбинантных белков. Также представлены результаты исследования иммуногенности и характеристики полученных белков с использованием методов электрофореза в ПААГ, ИФА и иммуноблоттинга.

Конструирование рекомбинантных плазмидных ДНК, содержащих целевые гены

Система экспрессии дрожжей *Pichia pastoris* в настоящее время является одной из наиболее прогрессивных систем для получения рекомбинантных белков в промышленных масштабах. Накопление значительной биомассы при выращивании на недорогих питательных средах, отсутствие пирогенов и эндотоксинов, а также высокий уровень синтеза гетерологичных белков являются отличительными свойствами дрожжей *Pichia pastoris*.

Для создания новых рекомбинантных ДНК, кодирующих PreS2-S белок в *Pichia pastoris* были использованы трансферные векторы pPIC3.5 (7751 п.н.) и pPIC9 (8023 п.н.), содержащие нуклеотидные последовательности генома *Pichia pastoris*, в том числе промотора *HIS4*, *AOX1* и др. Дрожжевой вектор pPIC9 дополнительно содержит сигнальные последовательности альфа-фактора (249 п.н.) для секреции экспрессируемого белка в питательную среду. Внедрение чужеродной кДНК в «мультиклонинг» сайт (полилинкер, состоящий из рестриктивных сайтов *Bam*HI, *Xho*I, *Eco*RI и др), кодирующей аминокислотную последовательность нужного белка, ставит её под контроль промотора гена *AOX1* (алкоголь оксидегидрогеназы). В качестве матрицы гена PreS2-S была использована рекомбинантная плаزمида pVacPAK-8-Polh-PreS2-S, предназначенная для экспрессии белка PreS2-S в бакуловирусах/клетках насекомых. В соответствии с генетической картой плазмиды pPIC3.5, pPIC9 и pVacPAK-8-Polh-PreS2-S были обработаны последовательно рестриктазами *Eco*RI и *Not*I. В результате были получены фрагменты векторов pPIC3.5, pPIC9 и кДНК PreS2-S с "липкими" концами, позволяющие провести «направленное» лигирование. Линейные фрагменты ДНК длиной 7745 п.н., 7999 п.н. и 965 п.н. выделяли после электрофореза в 0.7%-ном агарозном геле. Полученные фрагменты кДНК лигировали в молярном соотношении 1:10 (вектор: вставка) с использованием ДНК лигазы фага T4. Далее лигазной смесью проводили трансформацию «электрокомпетентные» клетки *Escherichia coli* NEB 5 α . В клонированных нами плазмидных ДНК содержится ген устойчивости к ампициллину, что позволяет проводить отбор бактерий, содержащих плазмидную ДНК. Скрининг полученных рекомбинантных клонов был проведен с помощью ПЦР с использованием следующих праймеров к PreS2-S белку HBV.

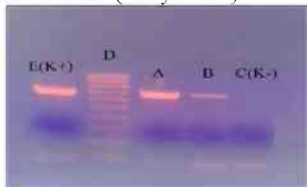
pPIC3.5-PreS2-S:1) 5'-CGGATCCAAAAATGTCTCAGTGGAAC-3'

2) 5'-TGTTGAATTCAATGTATACCCAAA-3'

pPIC9-PreS2-S: 1) 5'-CCTCGAGAAAAATGTCTCAGTGGAAC-3'

2) 5'-TGTTGAATTCAATGTATACCCAAA-3'

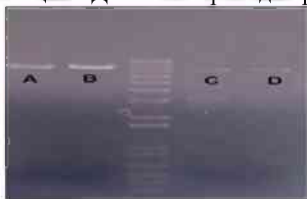
ПЦР-продукты анализировали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле (Рисунок 1).



- А – pPIC3.5- PreS2-S;
- В – pPIC9- PreS2-S;
- С (К-) - ДНК, выделенная из крови HBV «отрицательных» людей;
- Д – ДНК линейка (Маркер);
- Е (К+) - ДНК, выделенная из крови HBV «положительных» пациентов

Рисунок 1. Гель-электрофорез трансформантов, содержащих целевой ген.

Наличие фрагмента ДНК с молекулярной массой 965 п.н. свидетельствовал о наличии вставки - кДНК PreS2-S в исследуемых плаزمиде (рисунок 1, А и В). Таким образом, методом ПЦР были выявлены клоны, содержащие PreS2-S регион ДНК HBV. Для определения правильности ориентации кДНК был проведен рестриктивный анализ.



- А - pPIC3.5- PreS2-S/ EcoRI;
- В - pPIC9- PreS2-S/ EcoRI;
- С - pPIC3.5/ EcoRI;
- Д- pPIC9/ EcoRI

Рисунок 2. Рестрикционный анализ рекомбинантных плазмид

При расщеплении рекомбинантных плазмид pPIC3.5- PreS2-S и pPIC9- PreS2-S ферментом EcoRI, были получены линейные формы рекомбинантных плазмид, размером 8707 и 8980 п.н. (рисунок 2). Дальнейшим расщеплением плазмид рестриктазой NotI были получены фрагменты с массами 7.75, 8.023 т.п.н. и 965 п.н. которые свидетельствуют о «правильной» ориентации кДНК PreS2-S гена вируса гепатита В в полученных рекомбинантных плазмиде.

Таким образом были сконструированы рекомбинантные плазмиде, в которых показано наличие PreS2-S регион ДНК HBV в правильной ориентации под промотором гена AOX1.

В рамках диссертационной работы была определена нуклеотидная последовательность клонированного фрагмента ДНК гена PreS2-S в рекомбинантных плазмиде и выявлено, что она соответствует генотипу D HBV наиболее распространенного, в том числе в Узбекистане. Последовательность нуклеотидов, кодирующих рекомбинантный белок PreS2-S зарегистрировали в международной базе данных NCBI GenBank ID MT023508 (National Center for Biotechnology Information, США, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MT023508.1/>).

Для оценки уровня экспрессии гетерологичных белков в клетках дрожжей *Pichia pastoris* в целом, в качестве «модельного» мы выбрали белок GFP-зеленый флуоресцентный белок, с молекулярной массой около 27 кДа (719 п.н.). На основе результатов анализа нуклеотидных последовательностей NCBI, а также исходя из характеристик клонируемых векторов для амплификации гена GFP были синтезированы следующие праймеры: BamHI 5'-GAAGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGA-3' (F-pPIC3.5); XhoI 5'-

TCCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGA-3' (F-pPIC9); EcoRI 5'-AGGGAATTCCTGTACAGCTCGTCCATG-3' (R-pPIC3.5, pPIC9).

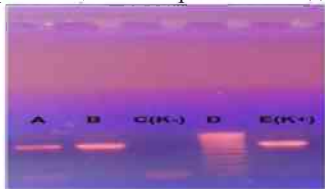
Клонирование рекомбинантных плазмид pPIC3.5-GFP и pPIC9-GFP было проведено аналогичным образом. Трансферные векторы pPIC3.5 и pPIC9 были последовательно обработаны рестриктазами BamHI/EcoRI и XhoI/EcoRI для получения линейных форм. В качестве основы (матрицы) использовали рекомбинантную плазмидную ДНК pVasPAK8-Polh-EGFP, депонированную в лаборатории молекулярной генетики ИХРВ АН РУз, содержащую данный ген. После лигирования трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* NEB-5 α , скрининг полученных клонов проводили с помощью ПЦР и рестриктоного анализа.

Получение рекомбинантных штаммов дрожжей *Pichia pastoris*, кодирующих белки PreS2-S, S и GFP.

Рекомбинантные плазмиды pPIC3.5-PreS2-S, pPIC9-PreS2-S, pPIC3.5-GFP и pPIC9-GFP трансформировали в штамм дрожжей GS 115 *Pichia pastoris* с использованием метода электропорации. Установлено, что оптимальными условиями трансформации при которой образуется максимальное количество трансформантов являются линейаризация плазмид по сайтам Sac I, Sal I, Stu I или Bgl II, концентрация плазмидной ДНК - 0.5 мкг, оптическая плотность клеток OD600 = 2.0.

Селекция рекомбинантных клонов *Pichia pastoris*. Отбор штаммов, синтезирующих рекомбинантный белок.

В штамме *Pichia pastoris* GS115 ген гистидинолдегидрогеназы (*his4*), отвечающий за синтез гистидина мутирован, поэтому этот штамм не может расти в питательной среде без гистидина. В то же время трансферные векторы pPIC3.5 и pPIC9, выбранные для клонирования, содержат нативный ген *HIS4*, поэтому полученный рекомбинантный штамм *Pichia pastoris* обладает способностью расти в питательной среде, не содержащей гистидин. В наших предыдущих исследованиях мы обнаружили, что Mut⁺ и Mut^s фенотипические штаммы *P. pastoris*, синтезируют почти одинаковое количество белка S-NBsAg. Поэтому для селекции колоний, синтезирующих целевые рекомбинантные белки использовали питательную среду с минимумом метанола (ММ). Наличие соответствующих кДНК (интеграцию в геном GS115 *P. pastoris*) анализировали методом ПЦР (рисунок 3).



- A – pPIC3.5-PreS2-S;
- B – pPIC9-PreS2-S;
- C (K-) - ДНК, выделенная из крови HBV отрицательных людей;
- D – ДНК линейка;
- E (K+) - ДНК, выделенная из крови HBV «положительных» пациентов.

Рисунок 3. ПЦР анализ рекомбинантных колоний *P. pastoris* pPIC3.5-PreS2-S и pPIC9-PreS2-S.

Экспрессию целевых белков в отобранных после ПЦР колониях определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) (таблица 1). При

анализе использовали коммерческие наборы, такие как «Диагностические тест системы ИХРВ АН РУз» и Diagnostic Systems (Россия). В качестве препарата сравнения использовали «Hepatitis-B Vaccine (rDNA), Serum Institute of India».

Таблица 1

Анализ экспрессии PreS2-S белка в клетках *Pichia pastoris*

Образец	Степень разбавления	Результаты теста ИФА (OD -450 нм)
Общий белок, выделенный из клеток <i>Pichia pastoris</i> , синтезирующих PreS2-S (≈ 5 мг/мл)	1:1000	2.870
	1:10000	0.591
«Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India»	1:1000	≥ 3000 (out)
	1:10000	0.410
Стандарт положительного контроля в наборе		≥ 3000
Негативный контрольный стандарт из набора		0.095

Как видно из таблицы, в отобранных клонах *Pichia pastoris* эффективно синтезируется рекомбинантный белок PreS2-S. Селекцию клонов pPIC3.5-GFP и pPIC9-GFP, синтезирующих рекомбинантный белок GFP, также проводили с использованием метода ПЦР. Результаты показывают, что ген GFP интегрирован в дрожжи *GS115 Pichia pastoris* (рисунок 4). Экспрессию белка в клетках визуализировали по GFP-специфической флуоресценции (рисунок 5).



Рисунок 4. Результаты ПЦР рекомбинантных колоний pPIC3.5-GFP и pPIC9-GFP *P. pastoris*.

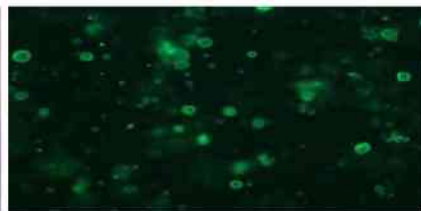


Рисунок 5. Визуализация рекомбинантных клонов GFP. Клетки, экспрессирующие GFP (зеленый цвет, 20 х увеличение)

Таким образом, на основании проделанных работ были отобраны рекомбинантные клоны *GS115 Pichia pastoris* pPIC3.5-PreS2-S, pPIC9-PreS2-S, pPIC3.5-GFP и pPIC9-GFP, содержащие необходимые кассеты экспрессии соответствующих белков.

Определение оптимальных условий культивирования рекомбинантных штаммов *Pichia pastoris*.

Известно, что количество получаемых рекомбинантных белков связано с технологическими процессами культивирования штаммов-продуцентов, и наибольшего выхода можно достичь путем подбора оптимальных условий.

Как отмечалось выше, клетки Mut+ фенотипа *Pichia pastoris* растут так же быстро, как штаммы дикого типа в метаноле, при этом уровни экспрессии pPIC3.5-PreS2-S и pPIC9-PreS2-S не различаются. Поэтому мы исследовали процесс выращивания рекомбинантных штаммов *Pichia pastoris*, относящихся к фенотипу Mut+ в ферментере (полупромышленный). В результате

экспериментов была разработана трехступенчатая стратегия культивирования. На первом этапе рекомбинантный штамм дрожжей выращивали в колбах (5% от общего объема, загружаемого в ферментер) в течение 18-20 часов. На втором этапе ферментер загружали питательной средой, содержащей 5% глицерина и 0,5% сорбитола. pH среды доводили до pH 5.0 с помощью 25% аммиака. Затем в ферментер добавляли указанную выше культуру клеток рекомбинантных дрожжей, в которой оптическая плотность составляла OD₆₀₀ = 5.0. При этом скорость вращения ферментера составляла 600 об/мин, а количество растворимого кислорода (DO) на уровне 25%. В начале следующей фазы (через 10 часов после инкубации в ферментере) к среде добавляли 12 мл/л РТМ1-содержащего 100% метанола в количестве 3,5 мл/л/ч (конц. в пределах 0,1% - 0,5%) в течение 4 ч. Процесс культивирования продолжали до достижения концентрации метанола в питательной среде 1% в течение следующих 50 часов. На данном этапе влажная биомасса клеток достигла 420 - 430 г/л. Аналогичные эксперименты проводились и со штаммом *S Pichia pastoris* - биомасса клеток составляла 420–430 г/л. В течение процесса культивирования был достигнут синтез рекомбинантного белка равного 10 000 доз (~10 мг/л) вакцины против HBV в ферментере объемом 10 л. При этом оптимальное время для культивирования рекомбинантных штаммов *Pichia pastoris*, обеспечивающего максимальный выход составило 90-92 часа, включая начальную стадию, что на 30% короче по сравнению со средним временем (120 часов), указанным в научной литературе для достижения аналогичного результата.

Экстракция и очистка целевых рекомбинантных белков из клеток дрожжей *Pichia pastoris*.

Для экстракции рекомбинантных белков из клеток *Pichia pastoris* были определены оптимальные условия гомогенизации клеток. Установлено, что гомогенизация клеточной биомассы с использованием стеклянных шариков (дм 0.5 мм, соотношение 1:1) при 1500 об/мин в теч. 15-20 мин (мельница) или обработка клеток под высоким давлением при 1200-1250 бар. является наиболее оптимальным. На следующем этапе очистки использовали фракционирование (NH₄)₂SO₄ в различных концентрациях. Результаты показали, что ступенчатое осаждение клеточного гомогената 25% и 75% солями (NH₄)₂SO₄ является наиболее эффективным для осаждения фракций, содержащих рекомбинантные белки PreS2-S и S (таблица 2, рис. 6).

Таблица 2

Результаты ИФА и содержание белков во фракциях

Сульфат аммония (%)	Образец	Процент общего белка (%)		Результаты ИФА (OD – 450 нм)	
		PreS2-S	S	PreS2-S	S
25	супернатант	94.8%	95.2%	1.810	1.689
	осадок	5.2%	4.8%	0.221	0.212
75	супернатант	66.8%	67.6%	0.320	0.318
	осадок	33.2%	32.4%	2.890	2.875
Стандарт положительного контроля в наборе				≥ 3000	
Отрицательный контрольный стандарт из набора				0.093	

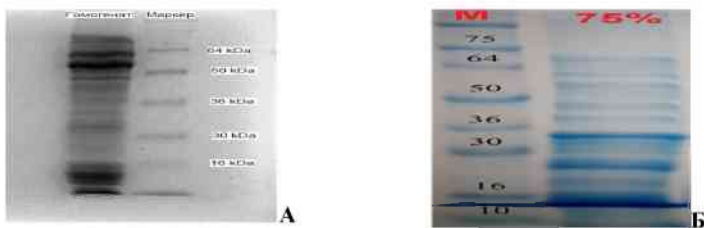


Рисунок 6. 10% ПААГ электрофорез гомогената клеток *Pichia pastoris* (А) и фракция, осажденная 75% сульфатом аммония (Б).

На следующем этапе фракции, содержащие рекомбинантные белки (осадок, после высаливания 75% раствором сульфата аммония) обессоливали методом гель-фильтрации на сефадексе G-25 (HiPrep 26/10 Desalting, 0.3 МПа, 11 мл/мин) или диализом. Обессоленные образцы высушивали на лиофильной сушке (Christ Alpha 1-2 Ldplus), затем растворяли в растворе PBS (150 мМ NaCl, 5,2 мМ Na₂HPO₄, 1,7 мМ КН₂РО₄, рН 7.8). Электрофореграмма полученных образцов (рисунок 6, Б) свидетельствует, что белковые образцы содержат низко и высокомолекулярные белки. В этой связи для удаления высокомолекулярных белков мы использовали гель-хроматографию на Sephadex G-200 SF. В ходе экспериментов на примере образцов, содержащих рекомбинантный белок S были определены оптимальные условия гель-хроматографии - скорость потока 2.6 мл/мин, элюент PBS (рН 7.8). Фракции были отобраны согласно результатам ИФА (рисунок 7).

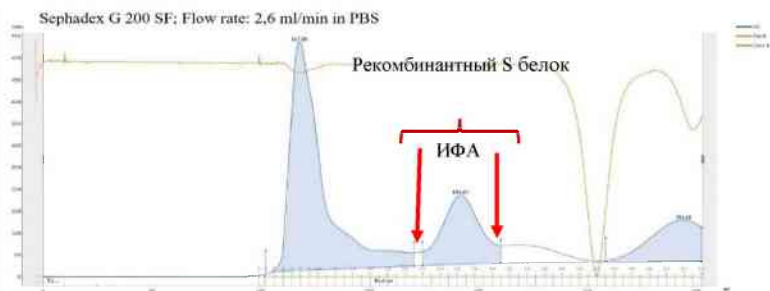


Рисунок 7. Хроматограмма процесса гель-фильтрации в PBS буфере (2,6 мл/мин, 0,34 МПа, рН 7.4)

Как видно из рисунка 7, на стадии гель-фильтрации с использованием Sephadex G-200 SF были получены фракции, содержащие необходимый рекомбинантный белок. Анализ образцов после хроматографии на Sephadex G-200 SF в 10% ПААГ показал, что фракция с наибольшим количеством целевого белка содержит 8 компонентов в диапазоне ММ от 15 до 60 кДа (рисунок 8). Следовательно, для очистки целевого рекомбинантного белка помимо гель-фильтрации на основе сефадекса должны быть применены ионообменная или другой тип хроматографии.



Рисунок 8. Гель-электрофорез фракций, содержащих белок S.

С этой целью фракции, содержащие рекомбинантный белок S очищали с помощью ионообменной хроматографии с использованием DEAE-сефарозы FF на колонке HiScale 50/20. Были определены оптимальные условия двухэтапного процесса: этап 1 - образец нанесли на колонку с промывочным буфером I (50 мМ Трис-НСl, рН 8.5) и удалили балластные белки (скорость потока - 3,5 мл/мин, детекция при 280 нм). Результаты ИФА показали, что белковые фракции, выделенные с использованием буфера I не содержат S белок (рис. 9, А); этап 2 - элюция целевого белка с использованием буфера II (50 мМ Tris- HCl, 500 мМ NaCl, рН 8.5, кондуктивность 50мS/см, скорость потока - 3,5 мл/мин). Фракции, содержащие по результатам ИФА S белок объединяли (рис. 9, Б).

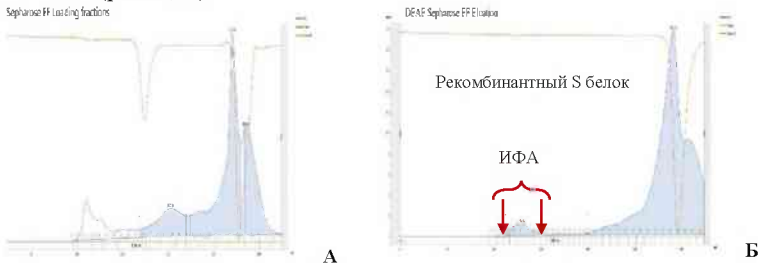


Рисунок 9. КХ на DEAE Sepharose FF. А. 1-этап. Б. 2-этап.

В результате по данным электрофореза в 10% ПААГ, фракции, полученные после хроматографии на DEAE Sepharose, содержат 4 белковых компонента в диапазоне от 15 до 45 кДа (рис. 10).

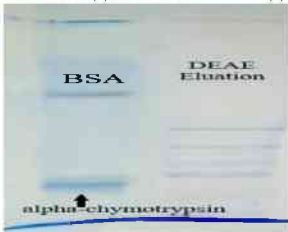


Рисунок 10. 10% ПААГ электрофорез фракции, полученной после ионообменной хроматографии на DEAE Sepharose FF.

В связи с этим для дальнейшей очистки целевого белка (ММ=24 кДа) использовали КХ на Sephadex G 75 pg (HiLoad 26/600), позволяющая разделить белки с молекулярной массой в диапазоне от 3 до 70 кДа. Эксперименты показали, что элюирование колонки PBS буфером (рН 7.8) при скорости

потока 2,6 мл/мин (0.34 МПа) является наиболее оптимальным (рис. 11, А). На заключительном этапе полученные фракции после Sephadex G 75 рекроматографировали в вышеуказанных условиях и определили их гомогенность (рис. 11, Б). На основе этих результатов был разработан лабораторный регламент по выделению и очистке рекомбинантного белка S из клеток *Pichia pastoris*.

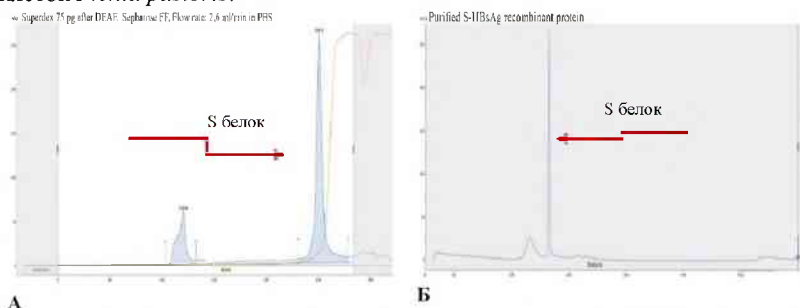


Рисунок 11. Хроматограмма КХ на Sephadex G 75 (HiLoad 26/600) (2.6 мл/мин, 0.34 МПа, PBS, pH 7.8). А, Б – рекомбинантный белок S.

Характеристика полученных рекомбинантных белков методами ПААГ-электрофореза, ИФА и иммуноблоттинга.

Для характеристики рекомбинантных белков PreS2-S и S, выделенных из клеток *Pichia pastoris* были использованы следующие методы: гель-электрофорез на 10% полиакриламиде (рис. 12), иммуноблоттинг и иммуноферментный анализ (таблица 3). По результатам электрофореза в ПААГ молекулярная масса очищенного рекомбинантного белка S составляет 24 кДа (рис. 12, А), а масса белка PreS2-S равно 34 кДа (рис. 12, С), что соответствует ожидаемой массе белков на основе их аминокислотной последовательности, кодируемой соответствующими генами.

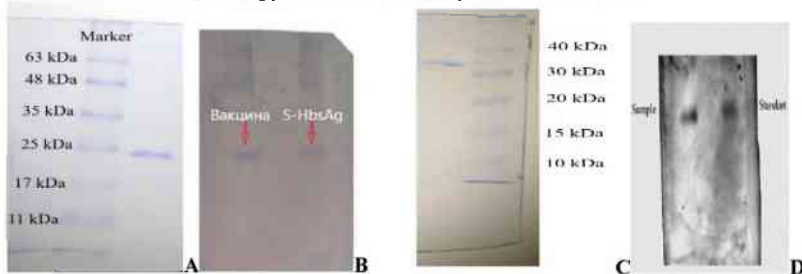


Рисунок 13. 10% ПААГ электрофорез и иммуноблот очищенных белков S и PreS2-S.

Результаты ИФА очищенных рекомбинантных белков показали, что рекомбинантные белки S и PreS2-S, выделенные из дрожжей *Pichia pastoris*, проявляют высокую антигенную специфичность по сравнению с коммерческими вакцинами (табл. 3). Антигенные свойства полученных рекомбинантных белков подтверждены иммуноблот-анализом (рис. 12, В, D).

Таблица 3

Результаты сравнительного ИФА рекомбинантных белков S и PreS2-S

Образец	ИФА (OD 450 нм)	Общий белок, мг/мл
Общий белок, выделенный из нормальных клеток <i>Pichia pastoris</i> (не содержащих рекомбинантные белки)	0,050	21.3×10^{-3}
«Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India»	2.425 (1:2000)	21.3×10^{-3}
Рекомбинантный S белок, выделенный из клеток <i>Pichia pastoris</i>	2.875 (1:2000)	21.7×10^{-3}
PreS2-S белок, выделенный из клеток <i>Pichia pastoris</i>	2.925 (1:2000)	21.7×10^{-3}

Исследование иммуногенности рекомбинантных белков S и PreS2-S.

Оценку иммунологической эффективности проводили сравнительным изучением уровня вырабатываемых антител в отношении полученных нами рекомбинантных белков S, PreS2-S. В качестве препарата сравнения служила вакцина «Hepatitis-B Vaccine (rDNA) 20 mcg/ml, Serum Institute of India». (Таблица 4).

Таблица 4

Сравнительная оценка иммунологической эффективности рекомбинантных белков методом ИФА

Группа животных	ИФА (OD - 450 нм)	
Мыши, иммунизированные рекомбинантным S белком (Группа 1)	1	1.810
	2	2.045
	3	2.156
	4	1.870
	5	2.010
Мыши, иммунизированные рекомбинантным PreS2-S белком (Группа 2)	1	1.833
	2	2.310
	3	2.566
	4	1.970
	5	2.056
Мыши, иммунизированные коммерческой вакциной (Группа 3)	1	1.837
	2	1.649
	3	2.060
	4	1.680
	5	2.130
Мыши, иммунизированные лизатом из дрожжей <i>Pichia pastoris</i> , не содержащих рекомбинантные белки (Группа 4)	1	0.220
	2	0.262
	3	0.214
	4	0.250
	5	0.198

Как видно из таблицы 4, рекомбинантные белки S и PreS2-S, экспрессируемые в дрожжевых клетках *Pichia pastoris*, проявляют более высокую иммуногенную активность по сравнению с коммерческой вакциной.

Получение рекомбинантных белков в системе экспрессии бакуловирусы/личинки тутового шелкопряда *Bombyx mori*. Клонирование рекомбинантной плазмиды, кодирующей рекомбинантный белок MIS - Ингибирующую субстанцию Мюллера.

Очевидно, что синтез рекомбинантных белков в культуре клеток насекомых является довольно сложным и дорогостоящим процессом. В этой связи, с целью его удешевления была поставлена задача использовать личинки *Bombyx mori* для биотехнологического получения MIS белка. С этой целью клонировали рекомбинантную плазмиду pBacPAK8-polh-MIS, содержащую ген MIS и на её основе получили рекомбинантный бакуловирус, который экспрессирует целевой белок в личинках тутового шелкопряда. Ген MIS был «вырезан» из плазмидной ДНК pBs-Ac-polh-MIS, предназначенной для экспрессии в клетках *Autographa californica* с помощью фермента EcoRI. Бакуловирусный вектор pBacPAK8, предназначенный для клонирования в *Bombyx mori*, также обрабатывали данной рестриктазой для обеспечения комплементарности и образования "липких" концов (рис. 14).



Рисунок 14. Расщепление трансферного вектора pBacPAK8 (А) и плазмиды pBs-Ac-polh-MIS (Б, С) рестриктазой EcoRI.



Рисунок 15. Рестрикция рекомбинантной плазмиды pBacPAK8-polh-MIS (С) по сайту EcoRI.

Как видно из рисунка 14, в результате рестрикции образуются линейные фрагменты ДНК трансферного вектора pBacPAK8 (5538 п.н.), плазмиды pBs-Ac-polh-MIS (3651 п.н.) и гена MIS (2058 п.н.). После выделения целевых фрагментов ДНК из геля была проведена обработка щелочной фосфатазой во избежание «замыкания» плазмид и проведена лигирование с применением ДНК-лигазы фага Т4 в молярном соотношении 1:10 (вектор: вставка). Далее лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* *NEB 5a*. Клонированная рекомбинантная плазида pBacPAK8-polh-MIS содержит ген «устойчивости» к ампициллину, поэтому в селективной среде с ампициллином растут только те клоны, которые содержат рекомбинантные плазмиды. Трансформанты, выросшие на среде с ампициллином, подвергли рестрикционному и ПЦР анализу. Для этого pBacPAK8-polh-MIS обрабатывали рестриктазой EcoRI, в результате (рис. 15) чего образовались фрагменты ДНК соответствующих размеров.

Для скрининга рекомбинантных клонов методом ПЦР были синтезированы следующие праймеры: MIS-1F ATGCGGGACCTGCCTCTACCA; MIS-2R AGGCTCTGGGCACCCGGCAG (размер амплификата 538 п.н.); MIS-3F CTGCCGGGTGCCAGAGCCT; MIS-3R

TCCGACAGGTTGACTAGGCCCT (размер амплификата 433 п.н.); MIS-4F AGGGCCTAGTCAACCTGTCGGA; MIS-4R TCTCGGGGATGAGTAC GGAGCGCT (размер амплификата 459 п.н.); MIS-5F AGGGCCTAGTCAACCTGTCGGA; MIS-4R TCACCGGCAGCCACACTCGG (размер амплификата 759 п.н.). Как видно из рисунка 16 в результате ПЦР плазмиды рВасРАК8-polh-MIS были получены амплификаты ожидаемых размеров. Таким образом, было установлено, что в плазмидную ДНК рВасРАК8-polh-MIS клонирован полноразмерный ген MIS.



Рисунок 16. ПЦР анализ плазмиды рВасРАК8-polh-MIS на содержание гена MIS.

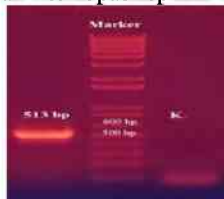


Рисунок 17. ПЦР анализ по определению правильной ориентации гена MIS.

Далее для определения ориентации клонированного фрагмента кДНК MIS в плазмиде рВасРАК8-polh-MIS были синтезированы специфические праймеры со следующими структурами: F-5'-TTGTTAAAAATAACAGCCATT-3' (на участок промотора Polh); R-5'-TCTAAGCGCCTATGAGCA-3' (на участок гена MIS). Фрагмент ДНК (амплификат) размером 513 п.н. после ПЦР (рис. 17), соответствует теоретическому размеру. Следовательно, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что целевой ген MIS клонирован в правильной ориентации под промотором гена *polh* в рекомбинантной плазмиде рВасРАК8-polh-MIS. Проведено секвенирование нуклеотидной последовательности клонированного фрагмента гена MIS в рекомбинантной плазмиде рВасРАК8-polh-MIS, в результате было установлено, что она соответствует ДНК гена MIS человека. Данную последовательность зарегистрировали в международной базе данных NCBI GenBank ID 2480761 (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine).

Получение рекомбинантного бакуловируса, экспрессирующего целевой белок MIS.

Для создания рекомбинантного бакуловируса, экспрессирующего белок MIS, использовали гомологичную рекомбинацию между плазмидной ДНК рВасРАК8-polh-MIS, содержащего целевой ген и геномную ДНК вируса ядерного полиэдроа дикого типа *Bombyx mori* (*BmNPV*), с последующей ко-трансфекцией клеток *Bombyx mori* (BMN1) с использованием липосомального реагента Metafectene. Отбора и очистки рекомбинантных клонов от бакуловирусов дикого типа проводили методом *Plaque assay*, а для достижения генетической гомогенности вирусных клонов использовали метод TCID₅₀. В результате проделанных работ добились очистки и наработки рекомбинантного вирусного стока концентрация которого составляет $C=2 \times 10^6$ копий в 1 мл культуральной среды.

Выявление породы тутового шелкопряда, синтезирующей наибольшее количество рекомбинантного белка MIS.

Подготовленным вирусным стоком проводили инфицирование личинок (гусениц) тутового шелкопряда. Для инфицирования отбирались 4 породы личинок *Bombyx mori*, распространенных в Узбекистане - “Марварид” (1), “Орзу” (2), “Гузал” (3) и “Юлдуз” (4). Ежедневно, начиная с третьего дня после инфицирования, количество MIS белка, синтезированного в личинках, анализировали с помощью ИФА (таблица 5).

Таблица 5

Результаты иммуноферментного анализа белка MIS

День	Результат ИФА (OD-450 нм)						
	Исследуемые породы тутового шелкопряда						
	Марварид	Орзу	Гузал	Юлдуз	Полож. контроль	Отриц. контроль	Неинфици. гусеницы
3	0.794	0.453	0.682	0.547	3.000	0.097	0.082
4	1.992	1.562	1.702	1.532			
5	>>3.000	2.422	2.897	2.584			

Как видно из таблицы 5, наибольшее количество рекомбинантного белка MIS продуцируется в личинках тутового шелкопряда породы «Марварид» на 5-й день после инфицирования.

Методы электрофореза в ПААГ и иммуноблоттинга использовали для характеристики полученного рекомбинантного белка MIS. Для этого отобранные личинки *Bombyx mori* экстрагировали в 0.1 М Трис-буфере, pH 7.8, содержащего 0.4% SDS, 2.4 мМ EDTA, 2 мМ PMSF в соотношении 1:5 (1 г биомассы:5 мл буфера) в течение 4 ч., с последующей обработкой гомогената ультразвуком при 22 кГц. Затем гомогенат центрифугировали, супернатант отделяли и желаемую белковую фракцию осаждали 45% раствором сульфата аммония.

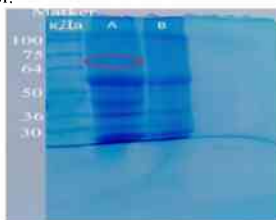


Рисунок 18. Электрофорез белка MIS в 10% ПААГ. А) Гомогенат личинок тутового шелкопряда, содержащих белок MIS. В) Гомогенат неинфицированных гусениц.

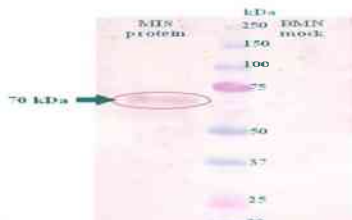


Рисунок 19. Иммуноблот белка MIS, полученный в личинках тутового шелкопряда.

Результаты гель-электрофореза (рис. 18) в 10% ПААГ показали, что молекулярная масса полученного нами рекомбинантного белка MIS составляет 70 кДа (мономер), что соответствует его молекулярной массе, рассчитанной на основе аминокислотной последовательности. Результаты иммуноблоттинга показали, что синтезированный в личинках тутового шелкопряда рекомбинантный белок MIS, проявляет антигенную

специфичность относительно моноклональных антител к человеческому белку MIS.

Таким образом, установлено, что экспрессированный в личинках *Bombyx mori* рекомбинантный белок MIS, имеет молекулярную массу 70 кДа (мономер) и антигенную специфичность соответствующую нативному белку MIS человека.

Получение штаммов микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам и скрининг на биологическую активность.

Для проведения *in vitro* тестов на антимикробную активность получили мультирезистентные штаммы *Escherichia coli* и *Pichia pastoris*. Для получения резистентного штамма бактерии *Escherichia coli*, устойчивого к ампициллину, карбенициллину, неомицину, канамицину и гентамицину (G418, гентамицин В1) был выбран трансферный вектор pсDNA3.1 (5428 п.н.), содержащий: «Ген AmpR» размером 861 п.н., кодирующий бета-лактамазу, который расщепляет такие антибиотики, как ампициллин, карбенициллин и др. содержащие бета-лактомное кольцо. «Ген Neo/KanR» размером 975 п.н., кодирующий аминокликозид фосфотрансферазу, который расщепляет аминокликозидные антибиотики, такие как канамицин, неомицин и гентамицин В1. Для получения резистентного штамма дрожжей *Pichia pastoris* к антибиотику Зеоцину (Флеомицин D1, гликопептидный антибиотик), был выбран трансферный вектор pPICZ α A, содержащий «ген BleoR» размером 375 п.н., кодирующий фермент, который расщепляет молекулы блеомицинового ряда.

Плазмиды pсDNA3.1 и pPICZ α A были внедрены в клетки с использованием метода электропорации. Колонии, образовавшиеся после процесса трансформации, выращивали в питательной среде, содержащей перечисленные антибиотики или их комбинацию, и таким образом, были отобраны рекомбинантные колонии, которые проявляют устойчивость к вышеуказанным антибиотикам.

Исследование антибактериальной и противогрибковой активности веществ природного и синтетического происхождения.

Провели скрининг на антибактериальную и противогрибковую активность более чем 350 образцов природного и синтетического происхождения. Среди них исследованы экстракты из более чем 90 растений местной флоры, используемых в народной медицине для лечения различных инфекционных заболеваний, эфирные масла, индивидуальные вещества, выделенные из этих растений и их синтетические производные.

Результаты *in vitro* скрининга на антибактериальную и противогрибковую активность показали, что спиртовые экстракты растений *Cnicus sp.* и *Potentilla asiatica* проявляют высокую антибактериальную активность против штаммов бактерий устойчивых к ампициллину и канамицину (табл. 6). Дальнейшие исследования, направленные на выявление индивидуальных компонентов, обладающих антимикробной активностью, входящих в состав исследуемых экстрактов позволит создать эффективные лекарственные препараты.

Среди синтетических соединений - 1,11-бис- (6,7-диметокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-1-ил) ундекан оказался наиболее активным в отношении условно-патогенного грибка *Candida albicans* (Таблица 6).

Таблица 6

Антибактериальная и противогрибковая активность экстрактов и индивидуальных соединений

Образец	Диаметр зоны ингибирования (mm, ± SD, P≤0.05)						
	Грам-положительные бактерии		Грам-отрицательные бактерий			Гриб	Дрожжи
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli Resist +</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. pasotirs Resist+</i>
<i>Cnicus sp.</i>	26.04± 0.10	25.04± 0.10	22.08 ±0.12	21.08± 0.12	22.08± 0.12	na	na
<i>Potentilla asiatica</i>	20.04± 0.10	18.08± 0.12	16.08 ±0.12	16.08± 0.12	12.08± 0.12	na	na
1,11-бис... ундекан	22.04± 0.10	15.04± 0.10	16.08 ±0.12	16.08± 0.12	16.08± 0.12	24.04± 0.10	12.08± 0.12
Ампициллин	27.08± 0.12	26.04± 0.10	26.08 ±0.12	na*	nt	nt	nt
Цефтриаксон	nt	nt*	26.12 ±0.13	na	26.08± 0.12	nt	nt
Флюканазол	nt	nt	nt		nt	28.04± 0.10	nt

На 1,11-бис-(6,7-диметокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-1-ил) ундекан получен патент на изобретение Республики Узбекистан (Uz №IAP 05940), что дает возможность его использовать в качестве основы для создания нового противогрибкового средства.

ВЫВОДЫ

1. Впервые клонированы рекомбинантные плазмиды pPIC3.5-PreS2-S и pPIC9-PreS2-S, кодирующие PreS2-S регион поверхностного антигена вируса гепатита В (HBV) в дрожжах *Pichia pastoris*. Определена нуклеотидная последовательность клонированного фрагмента ДНК «PreS2-S» и выявлено её соответствие генотипу D HBV.

2. На основе клонированных плазмид получены новые штаммы дрожжей *Pichia pastoris*, экспрессирующие рекомбинантный PreS2-S белок. Антигенная специфичность и экспрессия рекомбинантного белка PreS2-S подтверждена методами ПЛАГ (34 кДа), ИФА и иммуноблотинга.

3. Впервые разработаны технологические условия культивирования рекомбинантных штаммов pPIC9-PreS2-S и pPIC9-S *Pichia pastoris* (состав питательной среды, время, pH, DO, температурный режим), позволяющие получить наибольшее количество биомассы клеток (420-430 г/л), что приводит к синтезу рекомбинантных PreS2-S и S белков – субстанции для получения вакцин в количестве ≈10 мг/л (1000 доз субстанции вакцины/л).

4. Впервые разработаны методы выделения, очистки и стандартизации рекомбинантных белков PreS2-S и S HBV из *Pichia pastoris* - подобраны оптимальные условия гомогенизации, градиенты осаждения сульфатом аммония, хроматографии на сорбентах Sephadex G-200 SF, DEAE Sepharose FF и Supredex 75pg.

5. При сравнительном изучении иммуногенности *in vivo* полученных

рекомбинантных белков с коммерческими вакцинами (Hepatitis-B Vaccine (rDNA), Serum Institute of India; Euvax B, Sanofi Pasteur Korea Ltd). установлено, что рекомбинантные белки PreS2-S и S проявляют аналогичный иммунный ответ.

6. Впервые клонирована бакуловирусная рекомбинантная плазмида pVacPAK-8-Polh-MIS, кодирующая белок MIS (Ингибирующая субстанция Миоллера) в клетках насекомых *Bombyx mori*. Проведено секвенирование фрагмента ДНК MIS гена и установлена её идентичность MIS генома человека.

7. Методом ПААГ электрофореза и иммуноблотинга установлено, что рекомбинантный белок MIS имеет ту же молекулярную массу 70 кДа (мономер) и проявляет антигенную специфичность, соответствующую белку MIS человека.

8. Методом сравнительного исследования наиболее распространённых в Узбекистане 4 пород тутового шелкопряда *B. mori* выявлена порода – “Марварид”, продуцирующая наибольшее количество рекомбинантных белков с правильными пост-трансляционными модификациями *in vivo*, что позволяет использовать эту породу в биотехнологии.

9. Методом клонирования получены штаммы бактерий *Escherichia coli* и дрожжей *Pichia pastoris*, резистентных к ампициллину, карбенициллину, неомицину, канамицину, генетицину (гентамицин В1) и зооцину (флеомицин D1) для выявления соединений, обладающих антимикробной активностью, резистентных к вышеперечисленным антибиотикам.

10. Проведен *in vitro* скрининг антибактериальной и противогрибковой активности 350 образцов природного и синтетического происхождения, включая экстракты растений, используемых в народной медицине в качестве антимикробных средств, выделенные из этих растений индивидуальные вещества и их синтетические производные, из более чем 90 видов растений флоры Узбекистана.

11. Установлено, что 1,11-бис- (6,7-диметокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-1-ил) ундекан проявляет высокую противогрибковую активность относительно штамма *Candida albicans*, экстракты растений *Cnicus sp.* и *Potentilla asiatica* проявляют выраженную антибактериальную активность относительно грамположительных и грамотрицательных штаммов бактерий, в том числе резистентных к ампициллину и канамицину.

**SCIENTIFIC COUNCIL ON AWARDING SCIENTIFIC DEGREES
DSc.02/30.12.2019.K/B.37.01 AT THE INSTITUTE OF THE BIOORGANIC
CHEMISTRY**

SASMAKOV SOBIRDJAN ANARMATOVICH

**GENETIC TRANSFORMATION OF CELLS FOR THE OBTAINING
OF RECOMBINANT PROTEINS AND THE STUDY OF BIOLOGICAL
ACTIVITY**

02.00.10 – Bioorganic chemistry

**DISSERTATION ABSTRACT
FOR THE DOCTOR OF SCIENCES ON BIOLOGICAL SCIENCES
(DSc)**

Tashkent – 2021

The title of the dissertation of doctor of sciences (DSc) has been registered by the Supreme Attestation Commission at the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan with registration numbers of B2021.4.DSc/B151

The dissertation has been carried out at the Institute of the Chemistry of Plant Substances.

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (resume)) languages on the website of the Scientific Council (www.biochem.uz) and on the website of «ZiyoNet» information and educational portal (www.ziyo.net).

Scientific advisor: **Azimova Shakhnoz Sadikovna**
doctor of sciences in biology, professor

Official opponents: **Akhunov Ali Akhunovich**
doctor of sciences in biology, professor
Dalimova Surayyo Nigmanovna
doctor of sciences in biology, professor
Rhakhmanberdieva Rano Karimovna
doctor of sciences in chemistry


Leading organization: **Tashkent Pharmaceutical Institute**


Defense will take place on « » _____ 2021 year at the meeting of the Scientific Council DSc.02/30.12.2019.K/B.37.01 of the Institute of the Bioorganic Chemistry at the following address: 100125, Tashkent, 83, M. Ulugbek street. Phone: (+99871) 262-35-40, Fax: (+99871) 262-70-63.

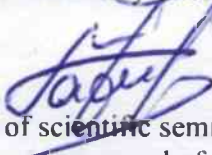
The dissertation has been registered at the Information Resource Centre of the Institute of the Bioorganic Chemistry (registration number № _____). Address: 100125, Tashkent, 83, M. Ulugbek street. Phone: (+99871) 262-35-40, Fax: (+99871) 262-70-63, e-mail: shsha@mail.ru.

Abstract of the dissertation is distributed on « » _____ 2021 y.
(protocol at the register No _____ dated « » _____ 2021 y).




Sh.I. Salikhov
Chairman of scientific council on award of scientific degrees, D.B.Sc., academician


Sh.A. Shomurotov
Scientific secretary of scientific council on award of scientific degrees, D.Ch.Sc.


M.B. Gafurov
Chairman of scientific seminar under scientific council on award of scientific degrees, D.Ch.Sc.

INTRODUCTION (abstract of DSc thesis)

The aim of research work is obtaining of recombinant proteins PreS2-S, S and MIS - Muellerian Inhibiting Substance in the yeast *Pichia pastoris* and in silkworm larvae (*Bombyx mori*), obtaining strains of microorganisms resistant to certain antibiotics and determination of antibacterial and antifungal activity of substances.

The objects of the research work are *Pichia pastoris* yeast strain, *Bombyx mori* cell culture, wild type nuclear polyhedrosis virus of *Bombyx mori*, transfer vectors pPIC3.5, pPIC9 and pBacPAK8, recombinant proteins PreS2-S, S and MIS, silkworm larvae of various breeds, plasmids containing antibiotic resistance genes, gram-positive and gram-negative bacterial strains, *Candida albicans*, plant extracts, individual compounds and their synthetic derivatives.

Scientific novelty of the research work:

- recombinant plasmids pPIC3.5-PreS2-S and pPIC9-PreS2-S encoding the PreS2-S surface antigen (865 bp) of the hepatitis B virus (HBV) in the yeast *Pichia pastoris* have been cloned for the first time;

- new recombinant strains of the yeast GS115 *Pichia pastoris* expressing the PreS2-S protein were obtained on the basis of the cloned plasmids;

- the technological conditions for the cultivation of the recombinant strains of *Pichia pastoris* pPIC9-PreS2-S and pPIC9-S have been determined for the first time;

- methods for isolation and purification of recombinant proteins PreS2-S and S from *Pichia pastoris* yeast cells have been developed for the first time;

- for the first time, the recombinant plasmid pBacPAK-8-Polh-MIS was cloned and on its basis a recombinant baculovirus encoding the recombinant protein MIS - Muellerian Inhibiting Substance was obtained;

- for the first time, the synthesis of the recombinant protein MIS has been carried out in silkworm larvae. It was found by PAGE electrophoresis and immunoblotting that the recombinant MIS protein has a molecular weight of 70 kDa (monomer) and exhibits antigenic specificity corresponding to the human MIS protein;

- strains of *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* yeast resistant to certain antibiotics were obtained by cloning;

- *in vitro* screening for antibacterial and antifungal activity of more than 350 samples of natural and synthetic origin, including extracts, essential oils, individual substances and their synthetic derivatives from more than 90 species of plants of the flora of Uzbekistan;

- it was revealed that 1,11-bis-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) undecane exhibits high activity against the pathogenic fungus *Candida albicans*; the extracts of plants *Cnicus* sp. and *Potentilla asiatica* exhibit pronounced activity against gram-positive and gram-negative bacterial strains, including strains resistant to ampicillin and kanamycin.

Implementation of the results based on scientific results obtained in the study of genetic transformation of *Pichia pastoris*, *Bombyx mori* cells, as well as bacteria for the production of recombinant proteins and screening of biological activity:

Received the patent for an invention of the Intellectual Property Agency of the Republic of Uzbekistan (UZ No. IAP 20160473) for the breed of silkworm larvae (*Bombyx mori*), producing the largest amount of recombinant protein. As a result, it becomes possible to use the local silkworm larvae in the biotechnological industry.

Received the patent for an invention of the Intellectual Property Agency of the Republic of Uzbekistan (UZ No. IAP 05940, 2019 y.) for 1,11-bis- (6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) undecane, exhibiting antifungal properties. As a result, it becomes possible to develop and use this compound in medicine as an antifungal agent.

The sequence of nucleotides encoding the recombinant protein PreS2-S is registered in the international database NCBI GenBank ID MT023508 (National Center for Biotechnology Information, USA, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT023508.1/>) and EMBL-EBI LR745788 (<https://www.ebi.ac.uk/>). As a result, it became possible to use this information for the comparative analysis of similar proteins at the international level.

The sequence of nucleotides encoding the recombinant protein S is registered in the international database NCBI GenBank ID MT023509 (National Center for Biotechnology Information, USA, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT023509.1/>) ва EMBL-EBI LR746134 (<https://www.ebi.ac.uk/>). As a result, it becomes possible to use this information to determine the location of antigenic determinants and their comparative analysis.

The sequence of nucleotides encoding the recombinant MIS protein is included in the international database NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) and registered with GenBank ID BankIt2480761 Seq3 MZ556958. As a result, it becomes possible to use this information for the comparative analysis of similar proteins on a global scale.

It was obtained the passport for the *Pichia pastoris* yeast strain synthesizing recombinant protein S, transferred to the collection of industrial microorganisms of the Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan (collection number No. СКБ-186 from 05.03.2020). As a result, the Republican collection of microorganisms of industrial importance was replenished with a new producer strain.

In the international edition Springer (New York-Heidelberg-Dordrecht-London) published the two volume Handbook (1070 pages): Handbook - "Natural Compounds: Plant Sources, Structure and Properties" 2013, Triterpene glycosides. V.5, Part 1. P.1-532 and Part 2. P.533-1070. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0541-2>, where materials on the physicochemical and biological properties of natural compounds, in particular triterpene glycosides, are systematized based on world literature. As a result, the possibility of using this information on a global scale has been created.

Scientific results on the study of the antibacterial and antifungal activity of compounds of natural and synthetic origin have been used in more than 40 foreign scientific journals with a high impact factor: (Antibiotics, 2020, 9(8), 441, IF=4.639; Journal of Ethnopharmacology 2020, 250, 112466, IF=4.360; Toxins, 2019, 11(10), 598, JCR IF=4.54; Molecules, 2021, 26(11), 3193, IF=4.411; Frontiers in microbiology 2020, 11, 424, IF=5.640, Natural product research, 2021, 35(4), 696-701, IF=2.158 and etc.). The use of the results of screening for antibacterial and antifungal activity made it possible to obtain data on biologically active substances and made it possible to conduct targeted studies of the chemical composition of plant objects, etc.

The structure and volume of the thesis. The thesis consists of an introduction, five chapters, conclusions, list of references and appendices. The volume of the thesis is 200 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ

Список опубликованных работ

List of published works

I бўлим (I часть, I part)

1. Sasmakov S.A., Putieva Zh.M. // Handbook- "Natural Compounds: Plant Sources, Structure and Properties" (Editor Shakhnoza S. Azimova). ISBN: 978-1-4614-0540-5, New York-Heidelberg-Dordrecht-London. Springer, 2013. - V.5, Part 1. - P. 1-532.
2. Sasmakov S.A., Putieva Zh.M. // Handbook- "Natural Compounds: Plant Sources, Structure and Properties" (Editor Shakhnoza S. Azimova). ISBN: 978-1-4614-0540-5, New York-Heidelberg-Dordrecht-London. Springer, 2013. - V., Part 2. - P. 533-1070.
3. Сасмаков С.А., Абдурахманов Дж.М., Терентьева Е.О., Саидов А.Ш., Виноградова В.И., Азимова Ш.С. 1,11-Бис-(6,7-диметокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-1-ил) ундекан, проявляющий противогрибковое действие. *ЎзР Интеллектуал мулк агентлиги ихтирога патент*. UZ №IAP 05940. Расмий ахборотнома №9, Стр. 43, 30.09.2019.
4. Топшева Н.А., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Аширов О.Н., Хасанов Ш.Ш., Пиякина Г.А., Азимова Ш.С., Исматуллаева Д.А., Зияева Я.М., Жуманиезов М.Ш. Рекомбинант PreS2-S оксилени тут ипак курти (*Bombux mori*) личинкаларида олиш усули ва юқори унумдор зотни аниқлаш. *ЎзР Интеллектуал мулк агентлиги ихтирога патент*. UZ №IAP 20160473.
5. Sasmakov S.A., Ashirov O.N., Abdurakhmanov J.M., Khasanov Sh.Sh, Eshboev F.B., Yusupova E.G., Piyakina G.A., Azimova Sh.S. Obtaining of recombinant PreS2-S protein of surface antigen HBV in *Pichia pastoris* expression system // *VaccinMonitor*, 2021. – V. 30(1). – P. 27-32 (Scopus, IF 0.4).
6. Mamadalieva N.Z., Youssef F.S., Ashour M.L., Akramov D.Kh., Sasmakov S.A., Ramazonov N.Sh., Azimova Sh.S. A comparative study on chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from three *Phlomis* species from Uzbekistan // *Natural Product Research*, 2021. - V. 35(4). – P. 696-701 (Scopus, IF 2.393).
7. Yusupova U.Yu., Sasmakov S.A., Usmanov D.A., Ramazonov N.Sh., Azimova Sh.S. Phytoecdysteroids from *Silene claviformis* and their antibacterial and antifungal activities // *Pol. J. Nature. Sc.*, 2021. – V. 35(3). – P. 313-321 (Scopus, IF 0.6).
8. Ashurova L.N., Bobakulov Kh.M., Ramazonov N.Sh., Sasmakov S.A., Ashirov O.N., Azimova Sh.S., Abdullaev N.D. Essential oil from the aerial part of *Saponaria griffithiana* and *S. officinalis* // *Chemistry of Natural Compounds*, 2021. – V. 57(5). - P. 970-972. (02.00.00; №1).
9. Ашурова Л., Сасмаков С., Аширов О., Рамазанов Н., Азимова Ш. Сапонины растения *Saponaria officinalis* и их противомикробная активность // *Узбекский биологический журнал*, 2020. - №2. - С. 8-11 (03.00.00; №5).
10. Абдурахманов Ж.М., Сасмаков С.А., Хасанов Ш.Ш., Аширов О.Н., Азимова Ш.С. Исследование фракции рекомбинантных белков из *Bombux mori* и *Pichia pastoris* методом нативного гель-электрофореза // *Химия и химическая технология*, 2020. - №1. - С. 60-63. <https://uzjournals.edu.uz/cce/vol2020/iss01/12>. (02.00.00; №3).

11. Сасмаков С.А., Аширов О.Н., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Азимова Ш.С. Оптимальные условия ферментации дрожжей *Pichia pastoris*, экспрессирующих рекомбинантный белок PreS2-S (M-HBsAg) поверхностного антигена вируса гепатита В (HBV) // Химия и химическая технология, 2020. - №3. – С. 56-59 (02.00.00; №3).

12. Ашурова Л.Н., Рамазонов Н.Ш., Олимов Х.К., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Азимова Ш.С. Антибактериальная активность эфирного масла растений *Saponaria officinalis* и *Saponaria griffithii* // Инфекция, иммунитет и фармакология, 2020. - №5. – С. 19-23 (03.00.00; №7).

13. Mamadalieva N.Z., Youssef F.S., Ashour M.L., Sasmakov S.A., Tiezzi A., Azimova Sh.S. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of three Uzbek Lamiaceae species // Natural Product Research, 2019. – V. 33(16). – P. 2394-2397. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1443088>. (Scopus, IF 2.393)

14. Ismailova D.S., Ziyaev A.A., Bobakulov Kh., Sasmakov S.A., Makhmudov U.S., Yusupova E., Azimova Sh.. The new Schiff bases of 2-alkylthio-5-(4-aminophenyl)-1,3,4-oxadiazoles and their antimicrobial activity // Journal of the Iranian Chemical Society, 2019. – V. 16(3). – P. 545-551 <https://doi.org/10.1007/s13738-018-1530-9> (Scopus, IF 2.019).

15. Nishanbaev S., Bobakulov Kh., Okhunedaeв B., Sasmakov S., Yusupova E., Azimova Sh., Abdullaev N. Component composition of the extracts and essential oils from the *Alhagi canescens*, growing in Uzbekistan and their antimicrobial activity // Natural Product Research, 2019. – V. 3(23). – P. 3417-3420. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1475384>. (Scopus, IF 2.393).

16. Ismailova D.S., Ziyaev A.A., Sasmakov S.A., Makhmudov U.S., Khasanov Sh.Sh., Azimova Sh.S., Elmuradov B.Zh. Synthesis and biological activity of 2-alkylthio-5-(4-N-acetyl (N-chloroacetyl)aminophenyl)-1,3,4-oxadiazoles // Bulgarian Chemical Communications, 2019. – V. 51(1). – P. 73-79. http://bcc.bas.bg/BCC_Volumes/Volume_51_Number_1_2019/BCC-51-1-2019-73-79-Ismailova-4697.pdf. (Scopus, IF 0.14).

17. Siddikov D.R., Bobakulov Kh.M., Nishanbaev S.Z., Sasmakov S.A., Abdullaev N.D., Azimova Sh.S. Phenolic Compounds from the Aerial Part of *Geranium transversale* and Their Antimicrobial Activity // Chemistry of Natural Compounds, 2019. – V. 55(2). - P. 348-350. <https://doi.org/10.1007/s10600-019-02687-7> (02.00.00; №1).

18. Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Азимова Ш.С. Подбор оптимальных условий индукции для получения наибольшего количества биомассы клеток дрожжей *Pichia pastoris* // Universum: Химия и биология. электрон. научн. журн., 2019. - № 10(64). – С. 16-18. <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/7778> (02.00.00; №2).

19. Хасанов Ш.Ш., Сасмаков С.А., Аширов О.Н., Абдурахманов Ж.М., Азимова Ш.С. Бакуловирусная система экспрессии, как безопасная и эффективная система для получения рекомбинантных белков // Universum: Химия и биология. электрон. научн. журн., 2019. - № 6(60). – С. 13-16. <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/7346> (02.00.00; №2).

20. Абдурахманов Ж.М., Сасмаков С.А., Хасанов Ш.Ш., Аширов О.Н., Эшбоев Ф.Б., Азимова Ш.С. Клонирование рекомбинантной плазмидной

ДНК pVасРАК8-polh- PreS2-S, кодирующий PreS2-S регион вируса гепатита В (HBV) в бакуловирусах // *Universum: Химия и биология. электрон. научн. журн.*, 2019. - № 10(64). - С. 25-28 <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/7857>. (02.00.00; №2).

21. Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Махнев А.А., Эшбоев Ф.Б., Юсупова Э.Г., Азимова Ш.С. Клонирование рекомбинантных плазмид pPIC3.5-S и pPIC9-S, кодирующие S регион вируса гепатита В человека (HBV) в GS115 *Pichia pastoris* // *Узбекский биологический журнал*, 2019. - №4. - С. 3-7. (03.00.00; №5).

22. Абдурахманов Ж.М., Сасмаков С.А., Хасанов Ш.Ш., Аширов О.Н., Эшбоев Ф.Б., Азимова Ш.С. Градиентное осаждение рекомбинантных белков, содержащихся в тутовом шелкопряде (*Bombyx mori*) с помощью сульфата аммония // *Химия и химическая технология*, 2019. - №2. - С. 77-79. (02.00.00; №3).

23. Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Садуллаев Т.Х., Пиякина Г.А., Азимова Ш.С. *Pichia pastoris* ачитки экспрессия тизимида рекомбинант оксиллар олиш учун макбул штамм ва трансфер векторларни танлаш // *Фармацевтический журнал*, 2019. - №1. - С. 103-106. (03.00.00; №2).

24. Ashirov O.N., Sasmakov S.A., Abdurahmonov J.M., Xasanov Sh.Sh., Sagdullayev T.X., Azimova Sh.S. Transfer vektorlarni *Pichia pastoris* achiqtisiga kiritishning elektroporatsiya sharoitlarini optimallashtirish // *SamDU «Ilmiy axborotnoma» jurnali*, 2019. - №5. - С. 145-148. (02.00.00; №9).

25. Хасанов Ш.Ш., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Аширов О.Н., Азимова Ш.С. Ҳашарот хужайра линияларини кўпайтиришнинг оптимал шароитларини танлаш // *Фармацевтический журнал*, 2019. - №1. - С. 106-109. (03.00.00; №2).

26. Akramov D.KH., Sasmakov S.A., Zengin G., Akbarov A., Ashirov O., Azimova Sh.S., Mamadaliyeva N.Z. Antimicrobial and antioxidant activities of the components of *Lagochilus* species from Uzbekistan // *Узбекский биологический журнал*, 2019. - №3. - С. 3-7. (03.00.00; №5).

27. Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Азимова Ш.С. Получение «зелёного флуоресцентного белка - GFP» в дрожжах *Pichia pastoris* как репортёр экспрессии гетерологичных белков // *Химия и химическая технология*, 2019. - №4. - С. 20-23. (02.00.00; №3).

28. Нишанбаев С.З., Бобакулов Х.М., Охундаев Б.С., Сасмаков С.А., Абдуллаев Н.Д., Арипова С.Ф. Компонентный состав экстрактов и эфирного масла *Alhagi persarum*, произрастающих в Узбекистане и их антимикробная активность // *Химия растительного сырья*, 2018. - №4. - С. 125-132. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1475384>. (02.00.00; №30).

29. Нишанбаев С.З., Бобакулов Х.М., Сасмаков С.А., Арипова С.Ф. Биологически активные соединения *Alhagi canescens* // *Фармацевтика журналы*, 2018. - №1. - С. 30. (03.00.00; №2).

30. Tosheva N.A., Sasmakov S.A., Abdurakhmanov J.M., Khasanov Sh., Ashirov O.N., Eshboev F., Azimova Sh.S., Ismatullaeva D.A., Ziyaeva Y.M., Umarov Sh.R. Different silkworm (*Bombyx mori*) breeds for obtaining of PreS2-S protein // *Uzbek Biological Journal*, 2017. - №4. - P. 6-9. (03.00.00; №5).

31. Terent'eva E.O., Saidov A.Sh., Khashimova Z.S., Tseomashko N.E., Sasmakov S.A., Abdurakhmanov D.M., Vinogradova V.I., Azimova Sh.S. Synthesis and Biological Activity of 1,11-bis(6,7-Methylenedioxy- and 6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin-1-YL)Undecanes // Chemistry of Natural Compounds, 2017. – V. 53(2). – P. 328-332. (02.00.00; №1)

32. Терентьева Е., Сасмаков С., Азимова Ш., Виноградова В., Абдурахманов Д., Хашимова З., Саидов А. Противомикробная активность и токсичность алкилтетрагидроизохинолинов // ВІСНИК Київського національного університету імені Тараса Шевченка. БІОЛОГІЯ, 2017. –V. 2(74). – P. 51-55. (03.00.00, №10).

33. Sasmakov S.A., Bobakulov Kh.M., Asilbekova D.T., Azimova Sh.S., Abdullaev N.D., Sagdullaev Sh.Sh. Antimicrobial activities of essential oils from three species of *Lamiaceae* growing in Uzbekistan // Uzbek Biological Journal, 2017. -№ 4. - P. 38-43. (03.00.00; №5).

34. Mamadalieva N.Z., Sasmakov S.A., Azimova Sh.S. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Nepeta cataria* and *Salvia officinalis* from uzbek flora // Uzbek chemical journal, 2017. - № 6. - P. 48-53. (02.00.00; №6).

35. Сасмаков С.А., Путиева Ж.М., Нигматуллаев А.М., Азимова Ш.С., Lindequist U. Цитотоксические свойства растений, используемых в народной медицине Узбекистана // Узбекский биологический журнал, 2012. - № 2. – С. 5-8. (03.00.00; №5).

36. Sasmakov S.A., Gazizov F.Yu., Putieva J.M., Wende K., Alresly Z., Lindequist U. Neutral lipids, phospholipids, and biological activity of extracts from *Zygophyllum oxianum* // Chemistry of Natural Compounds, 2012. – V. 48(1). - P. 11-15. (02.00.00; №1).

II Бўлим (II часть, II part)

37. Sasmakov S.A., Ashirov O.N., Abdurakhmanov J.M., Khasanov Sh.Sh., Eshboev F.B., Makhnev A.A., Azimova Sh.S. // Obtaining of “S region” of HBV surface antigen in *Pichia pastoris* GS115 // Journal of Critical Reviews, 2020. - V. 7(8). - P. 2601-2606.

38. Abdurakhmanov J.M., Sasmakov S.A., Ashirov O.N., Khasanov Sh.Sh., Eshboev F.B., Azimova Sh.S. Purification of recombinant PreS2-S protein the surface antigen of human Hepatitis B virus (HBV) expressed in *Bombyx mori* larvae // European Science Review, 2019. - № 9-10. - P. 7-10. <https://doi.org/10.29013/ESR-19-9.10-7-10>.

39. Asilbekova D.T., Bobakulov Kh.M., Sasmakov S.A., Abdurakhmanov J.M., Azimova Sh.S., Abdullaev N.D., Sagdullaev Sh.Sh. Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Daucus carota* L. subsp. *carota*, growing in Uzbekistan // American Journal of Essential Oils and Natural Products, 2017. – V. 5(4). - P. 09-13.

40. Ismailova D.S., Ziyaev A.A., Sasmakov S.A., Abdurakhmanov J.M., Azimova Sh.S. Synthesis, chemical transformation and antimicrobial activity of the products of 5-(4-aminophenyl)-1,3,4-oxadiazolin-2-thiones interaction to alkyl esters of haloacetic acids // Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences, 2017. – V. 5(1). – P. 17-22.

41. Ziyaev A.A., Tozhiev I.F., Sasmakov S.A., Azimova Sh.S., Elmuradov B.Zh., Ismailova D.S. Selective s-alkoxycarbonylation of isomeric 5-pyridyl-1,3,4-oxadiazoles and antimicrobial activity of the synthesized compounds // The Pharmaceutical and Chemical Journal, 2017. – V. 4(2). – P. 29-34.

42. Sasmakov S.A., Putieva Zh.M., Azimova Sh.S., Lindequist U. In vitro screening of the cytotoxic, antibacterial and antioxidant activities of some Uzbek plants used in folk medicine // Asian Journal of Traditional Medicines, 2012. - V.7(2). – P. 73-80.

43. Сасмаков С.А., Путиева Ж.М., Нигматуллаев А.М., Lindequist U. Антибактериальная активность некоторых растений узбекской флоры // Конференция молодых ученых посвящ. памяти С.Ю. Юнусова. 17 марта, 2011 г. Ташкент. Сборник тезисов. С. 21.

44. Sasmakov S.A., Putieva Zh.M., Nigmatullaev A.M., Azimova Sh.S., Lindequist U. // Screening of the antibacterial activity, cytotoxicity and antioxidant properties of extracts of some Uzbek plants // 9th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds, October 16-19, 2011. Urumqi, Xinjiang, China. P. 222.

45. Sasmakov S.A., Simakhina E.A., Makhnev A.A., Mansurov D.R., Azimova Sh.S. Designing of recombinant plasmid DNA pYES2/CT-preS2-S, encoding PRES2-S region of the human hepatitis B virus // Xth International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds November 21-23, 2013. Tashkent-Bukhara. P. 89.

46. Аширов О.Н., Абдурахманов Ж.М., Сасмаков С.А., Махнева Е., Азимова Ш.С. Получение рекомбинантных клеток *Pichia pastoris*, штамма GS115 методом электропорации // Конференция молодых ученых посвящ. памяти С.Ю. Юнусова, 12 марта, 2015. Ташкент. Сборник тезисов. С. 101.

47. Эшбоев Ф., Абдурахманов Ж., Аширов О., Хасанов Ш., Сасмаков С., Азимова Ш. Конструирование рекомбинантной плазмидной ДНК рВасРАК-8-EGFP-зеленый флуоресцентный белок в бакуловирусах // Мустақиллик йилларида Ўзбекистон таълим тизими: Ислохатлар, ютуқлар ва исдиқболлар. Республика илмий-амалий конференцияси материаллари. 22 сентябрь, 2016 й. 160-161 б.

48. Терентьева Е.О., Сасмаков С.А., Цеомашко Н.Е., Абдурахманов Ж.М., Аширов О.Н., Азимова Ш.С. Изучение биологической активности алкалоидов и их производных // *Acta Naturae* спец выпуск, 2016 г. Том 1. С. 98.

49. Эшбоев Ф., Абдурахманов Ж., Аширов О., Хасанов Ш., Сасмаков С., Азимова Ш. Рекомбинант рВасРАК-8-GFP плазмид ДНК сини идентификация қилиш // “Генетика, геномика ва биоинформатиканинг долзарб муаммолари ва исдиқболлари” мавзусидаги илмий-амалий конференция материаллари. 5 май, 2017 й. Тошкент. 248-249 б.

50. Mamadalieva N.Z., Sasmakov S.A., Azimova Sh.S. // Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Nepeta cataria* and *Salvia officinalis* from uzbek flora // Пятая международная конференция молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации», 8-9 декабря 2017 г., Шымкент, Казахстан. Республиканский научный журнал “Vestnik”. 2017. - № 4(81), Том IV. С. 133-136.

51. Ashirov O.N., Sasmakov S.A., Abdurahmonov J.M., Xasanov Sh.Sh., Azimova Sh.S. Use of *Pichia pastoris* expression system for obtaining of recombinant proteins // XII International Symposium «Actual Problems of Chemistry, Biology and Technology of Natural Compounds» Tashkent, September 7-8, 2017. P. 209.
52. Abdurakhmanov J.M., Xasanov Sh.Sh., Ashirov O.N., Tosheva N.A., Eshmuratova A.A., Sasmakov S.A., Azimova Sh.S. Designing of recombinant plasmid DNA pBacPAK8-TP, encoding target proteins in baculoviruses // XII International Symposium «Actual Problems of Chemistry, Biology and Technology of Natural Compounds» September 7-8, 2017. Tashkent, P. 211.
53. Tosheva N.A., Eshmuratova A.A., Abdurakhmanov J.M., Sasmakov S.A., Piyakina G.A., Azimova Sh.S. Determination of high-level producing Silk worm larvae sorts of recombinant proteins // XII International Symposium «Actual Problems of Chemistry, Biology and Technology of Natural Compounds» September 7-8, 2017. Tashkent, P. 212.
54. Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Аширов О.Н., Эшбоев Ф.Б., Икрамов С.А., Сасмаков С.А., Азимова Ш.С. Tut ipak qurti lichinkalaridan (*Bombyx mori* larvae) rekombinant oqsillar olish uchun «biofabrika» sifatida foydalanish // Фан ва таълимни ривожлантиришда ёшларнинг ўрни. 2018 й. Тошкент-Навоий. 77-78 б.
55. Каримова Н., Эшбоев Ф.Б., Аширов О., Хасанов Ш., Абдурахманов Ж., Сасмаков С.А., Азимова Ш. Исследование антибактериальной и противогрибковой активности растений флоры Узбекистана. “Ўзбекистонда генетика соҳасининг бугунги ҳолати, муаммолари ва истиқболлари” мавзусидаги Республика илмий-амалий конференцияси. 5 декабрь, 2018 й. Тошкент. Конференция материаллари. 228-230 б.
56. Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Аширов О.Н., Эшбоев Ф.Б., Икрамов С.А., Сасмаков С.А., Азимова Ш.С. Рекомбинант оксиларни аммоний сульфат тузи ёрдамида градиентлаб чўктириш // “Ўзбекистонда генетика соҳасининг бугунги ҳолати, муаммолари ва истиқболлари” мавзусидаги Республика илмий-амалий конференцияси, 5 декабрь 2018 й., Тошкент. Конференция материаллари. 129-130 б.
57. Аширов О.Н., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Эшбоев Ф.Б., Махнев А.А., Сасмаков С.А., Азимова Ш.С. Клонирование рекомбинантных плазмид PIC3,5-GFP и PIC9-GFP, кодирующие рекомбинантный GFP (зелёный флуоресцентный белок) в дрожжах *Pichia pastoris* // Научная и научно-техническая конференция Совета молодых ученых и Союза молодежи Узбекистана. 30 марта, 2018 г. Ташкент. С. 43-44.
58. Хасанов Ш.Ш., Абдурахманов Ж.М., Аширов, Ф.Б. Эшбоев, О.Н., Юсупова Э.Г., Сасмаков С.А., Азимова Ш.С. Котрансфекция ДНК трансферного вектора и ДНК вируса ядерного полиэдроса дикого типа wtBmprv в клетки *bombyx mori* bmn1 для проведения гомологичной рекомбинации // Научная и научно-техническая конференция Совета молодых ученых и Союза молодежи Узбекистана. 30 марта 2018 г., Ташкент. С. 166-167.

59. Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Аширов О.Н., Эшбоев Ф.Б., Икрамов С.А., Сасмаков С.А., Азимова Ш.С. Личинки тутового шелкопряда *Bombyx mori* в качестве «биореактора» для получения рекомбинантных белков // Научная и научно-техническая конференция Совета молодых ученых и Союза молодежи Узбекистана. 30 марта, 2018 г. Ташкент. С. 21-22.

60. Ashirov O.N., Sasmakov S.A., Abdurahmonov J.M., Xasanov Sh.Sh., Sagdullayev T.X., Azimova Sh.S. *Pichia pastoris* achitqisi genom DNK sini fermentlar ishtirokisiz ajratish // Фан ва таълимни ривожлантиришда ёшларнинг ўрни. Республика миқёсидаги илмий ва илмий-техник конференция материаллари. 22 ноябрь, 2019 й. Тошкент. 51 б.

61. Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Пиякина Г.А., Азимова Ш.С. Получение β-галактозидазы в дрожжах *Pichia pastoris* // «Химия и технология растительных веществ». Тезисы докладов XI Всероссийско научной конференции с международным участием и школой молодых ученых, 27-31 мая, 2019 г. Сыктывкар, Республика Коми, Россия. С. 45.

62. Abdurhakhmanov J.M., Sasmakov S.A., Khasanov Sh.Sh., Ashirov O.N., Eshboev F.B., Azimova Sh.S. The importance of the method of PAGE in the study of recombinant PreS2-S protein // Академия наук республики Узбекистан институт микробиологии. «Состояние и перспективы развития микробиологии и микробной биотехнологии в Узбекистане» 24 октября, 2019 г. Ташкент. С. 16-17.

63. Abdurhakhmanov J.M., Sasmakov S.A., Khasanov Sh.Sh., Ashirov O.N., Yusupova E.G., Eshboev F.B., Azimova Sh.S. Use of Superdex 75 pg HiLoad columns for purification of the proteins from Silkworm larvae and yeast of *Pichia pastoris* // Актуальные проблемы химии природных соединений. 18-19 марта, 2019 г., Ташкент.

64. Karimova N., Sasmakov S., Abdurakhmanov J., Eshboev F., Azimova Sh. Investigation of antibacterial and antifungal activity of the plants of Uzbekistan // 5th International Conference on Antibiotics & Antibiotic Resistance 2nd International Conference on Pharmaceutical Research & Innovations in Pharma Industry May 30-31, 2019. Orlando, USA.

65. Sasmakov S., Abdurakhmanov J., Khasanov Sh., Ashirov O., Yusupova E., Piyakina G., Azimova Sh. Obtaining of recombinant protein in the *Bombyx mori* expression system // XIII International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds, October 16-19, 2019. Shanghai. P. 26.

66. Sasmakov S.A., Khalilova E.Kh., Abdurakhmanov J.M., Azimova Sh.S., Aripova S.F. Biological activity of oleo-gym-resin of *Ferula tadshikorum* grown in Uzbekistan // XIII International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds, October 16-19, 2019. Shanghai. P. 193.

67. Хасанов Ш.Ш., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М. Аширов О.Н., Азимова Ш.С. Ҳашарот ҳужайра линияларини узоқ муддатли саклашнинг оптимал шароитлари // Научно-практическая конференция молодых учёных «Актуальные проблемы химии природных соединений», посвящённой 110-летию академика С.Ю. Юнусова. 19 марта, 2019 г., Ташкент. С. 52.

68. Хасанов Ш.Ш., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М. Аширов О.Н., Азимова Ш.С. Керакли генни экспрессияловчи рекомбинант rBmNPV- MIS

бакуловиринг клонларини тозалаш // Фан ва таълимни ривожлантиришда ёшларнинг ўрни. 2019 й. Тошкент 174-175 б.

69. Хасанов Ш.Ш., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Аширов О.Н., Эшбоев Ф.Б., Махнев А.А., Пиякина Г.А., Азимова Ш.С. *Spodoptera exigua* va *Lymantria dispar* ҳашоратларининг хужайра линияларини кўпайтиришнинг оптимал шароитларини аниқлаш // “Ўзбекистонда генетика соҳасининг бугунги ҳолати, муаммолари ва истиқболлари” мавзусидаги Республика илмий-амалий конференцияси. 5 декабрь 2018 й., Тошкент. 132-133 б.

70. Хасанов Ш.Ш., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Аширов О.Н., Эшбоев Ф.Б., Юсупова Э.Г., Азимова Ш.С. *Bombux mori* BMN1 hujayralarida gomologik rekombinatsiyani amalga oshirish uchun transfer vektor va virus DNK miqdorlarining optimal nisbati // Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 75 йиллик юбилейига бағишланган Республика миқёсидаги илмий ва илмий-техник конференция материаллари 23 ноябрь, 2018 й. Тошкент. 119 б.

71. Аширов О.Н., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Махнев А.А., Сасмаков С.А., Азимова Ш.С. *Pichia pastoris* ачитки экспрессия тизимида рекомбинант оксиллар олиш истиқболлари // “Ўзбекистонда генетика соҳасининг бугунги ҳолати, муаммолари ва истиқболлари” мавзусидаги Республика илмий-амалий конференцияси, 5 декабрь, 2018 й. Тошкент. 131-132 б.

72. Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Махнев А.А., Азимова Ш.С. *Pichia pastoris* ачитқи ҳужайраларига рекомбинант плазмидаларни трансформациялаш шароитларини танлаш // Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 75 йиллик юбилейига бағишланган Республика миқёсидаги илмий ва илмий-техник конференция материаллари. 23 ноябрь, 2018 й. Тошкент. 79 б.

73. Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Ж.М. Абдурахманов, Ш.Ш. Хасанов, А.А. Махнев, С.А. Икрамов, Ш.С. Азимова. Клонирование рекомбинантных плазмид рPIC3.5-B-GAL и рPIC9-B-GAL, кодирующих β-галактозидазу // Научно-практическая конференция молодых учёных «Актуальные проблемы химии природных соединений», посвящённой 110-летию академика С.Ю. Юнусова. 19 марта, 2019 г. Ташкент. С.18.

74. Абдурахманов Ж.М., Сасмаков С.А., Хасанов Ш.Ш., Аширов О.Н., Эшбоев Ф.Б., Икрамов С.А., Азимова Ш.С. Тут шаклида қурти личинкаларида синтезланган PreS2-S оксиллини гомоген ҳолда ажратиш олишда гел-филтрацион хроматография усули яқиний босқич сифатида // ЎЗР ФА «Фан ва таълимни ривожлантиришда ёшларнинг ўрни» Республика миқёсидаги илмий ва илмий-техник конференция материаллари. 22 ноябрь, 2019 й. Тошкент. 27-28 б.

75. Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Азимова Ш.С. PIC3,5-S ва PIC9-S рекомбинант плазмидаларининг *pichia pastoris* ачитқи хужайрасига интеграцияси // Ўзбекистоннинг таниқли биокимиё ва биотехнолог олим, академик А.Г. Холмуродовнинг 80 йиллигига бағишланган Республика илмий-амалий анжумани. 2019 й. Тошкент. 26 б.

76. Sasmakov S., Ashirov O., Abdurhakhmanov J., Khasanov Sh., Azimova Sh. Determination of inducing conditions for high level expression of recombinant protein in *pichia pastoris* // XIII International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds, October 16-19, 2019. Shanghai. P. 192.

77. Ziyaev A., Sasmakov S., Azimova Sh. Synthesis and antimicrobial activity of 2-alkyloxycarbonylthio-5-aryl-1,3,4-oxadiazoles // XIII International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds, October 16-19, 2019. Shanghai. P. 261.

78. Хасанов Ш.Ш., Абдурахманов Ж.М., Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Азимова Ш.С. Получение рекомбинантных бакуловирoс в системе экспрессии бакуловирoс // «Фан ва таълимни ривожлантиришда ёшларнинг ўрни» мавзусидаги Республика илмий ва илмий-техник конференция. 30 октябрь, 2020 й. Тошкент. 158 б.

79. Хасанов Ш.Ш., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Аширов О.Н., Азимова Ш.С. Мюллер ингибирловчи субстанциясининг инсон саратонини даволашдаги биологик роли // Биофизика ва биокимё муаммолари - илмий конференция материаллари. 22 май, 2020 й., 141 б.

80. Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Хасанов Ш.Ш., Абдурахманов Ж.М., Садуллаев Т.Х., Азимова Ш.С. *Pichia pastoris* ачитқиси оптик зичлигининг трансформация жараёнига боғлиқлиги // ЎЗР ФА «Фан ва таълимни ривожлантиришда ёшларнинг ўрни» Республика миқёсидаги илмий ва илмий-техник конференция материаллари 30 октябрь, 2020 й. Тошкент. 126-127 б.

81. Хасанов Ш.Ш., Абдужалилова З.Х., Абдурахманов Ж.М., Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Азимова Ш.С. Бакуловирoс ҳашарот хужайра линияларини субкультивирлаш // «Фан ва таълимни ривожлантиришда ёшларнинг ўрни» мавзусидаги Республика илмий ва илмий-техник конференция. 30 октябрь, 2020 й. Тошкент. 120-121 б.

82. Абдурахманов Ж.М., Сасмаков С.А., Хасанов Ш.Ш., Аширов О.Н., Эшбоев Ф.Б., Азимова Ш.С. *P. pastoris* ачитқисида экспрессияланган рекомбинант оксилнинг антигенлигини ўрганиш // «Фан ва таълимни ривожлантиришда ёшларнинг ўрни» мавзусидаги Республика илмий ва илмий-техник конференция. 30 октябрь, 2020 й. Тошкент. 124-125 б.

83. Аширов О.Н., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Садуллаев Т.Х., Пиякина Г.А., Сасмаков С.А., Азимова Ш.С. Рекомбинант *Pichia pastoris* ачитқи штамmlарини ферментёрда кўпайтиришнинг оптимал шароитларини аниқлаш // Биофизика ва биокимё муаммолари – 2020. Илмий конференция материаллари. 22 май, 2020 й. Тошкент, 54-55 б.

84. Хасанов Ш.Ш., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Аширов О.Н., Абдужалилова З.Х., Гайназарова С.А., Азимова Ш.С. Бакуловирoс ҳашарот хужайра экспрессия тизимида қўлланиладиган трансфер векторларнинг хусусиятларини тадқиқ қилиш // XXI аср – интеллектуал ёшлар асри. Республика илмий ва амалий-назарий анжуман тўплами. 24 апрель, 2021 й. Тошкент. 208-209 б.

85. Sasmakov S.A., Abdurakhmanov J.M., Eshboev F.B., Ashirov O.N., Khasanov Sh.Sh, Ortiqova M., Gaynazarova S., Piyakina G.A., Azimova Sh.S. Obtaining of resistant strains of microorganisms to antibiotics for in vitro evaluating

of antimicrobial activity // XIV International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds, October 7-8, 2021. Tashkent. P. 44.

86. Sasmakov S.A., Eshboev F.B., Abdurakhmanov J.M., Khasanov Sh.Sh., Ashirov O.N., Dolimov Kh., Mansurov D.R., Yusupova E.G., Azimova Sh.S. Antibacterial and antifungal activity of local plants // XIV International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds, October 7-8, 2021. Tashkent. P. 47.

87. Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Махнев А.А., Эшбоев Ф.Б., Юсупова Э.Г., Азимова Ш.С. Рекомбинантная плазмидная ДНК рPIC3.5-S, кодирующая S регион вируса гепатита В человека в *Pichia pastoris*. Заявка на патент РУз №IAP 20180245.

88. Абдурахманов Ж.М., Сасмаков С.А., Хасанов Ш.Ш., Аширов О.Н., Махнев А.А., Икрамов С.А., Эшбоев Ф.Б., Юсупова Э.Г., Азимова Ш.С. Рекомбинантная плазмидная ДНК рVasPAK8-polh-PreS2-S, кодирующая PreS2-S регион вируса гепатита В человека в бакуловирсах/клетках *Bombyx mori*. Заявка на патент РУз №IAP 20180266.

89. Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Хасанов Ш.Ш., Махнев А.А., Эшбоев Ф.Б., Юсупова Э.Г., Азимова Ш.С. Способ культивирования дрожжей штамма GS115 *Pichia pastoris*. Заявка на патент РУз №IAP 20190095. Расмий ахборотнома №9, Стр. 26, 30.09.2020.

