

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
**«Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук»
(ФИЦ ПНЦБИ РАН) .**

142290, г. Пушкино Московской обл., проспект Науки, д.3.
Тел./факс (4967)73-26-36, e-mail: info@pncbi.ru, http://www.psn.ru
ОКПО 02699688, ОГРН 1025007768983, ИНН/КПП 5039002841/503901001

08.02.2021 № 191-01-2115/59
На № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ФИЦ ПНЦБИ РАН

Грабарник П.Я.



«08» февраля 2021 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный
исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук».

Диссертация Пошихонцевой Вероники Юрьевны «Биосинтез макроциклического поликетиды такролимуса штаммами *Streptomyces tsukubaensis*» выполнена в лаборатории микробиологической трансформации органических соединений Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН) – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН).

В период работы над диссертацией соискатель работала в должности лаборанта в лаборатории микробиологической трансформации органических соединений ИБФМ РАН, с 2017 г. и по настоящее время она работает в должности младшего научного сотрудника.

В 2013 г. Пошихонцева В.Ю. окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского» с присуждением квалификации «Специалист по биоинженерии» по специальности «Биоинженерия и биоинформатика», в

2015 г. окончила магистратуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки высшего профессионального образования «Пушкинский государственный естественно-научный институт» (ПушГЕНИ) с присуждением степени магистра биологии по направлению «Биология».

Пошехонцева В.Ю. освоила программу подготовки научно-педагогических кадров в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки высшего профессионального образования ПушГЕНИ по направлению 03.02.03 – «Микробиология» в 2015-2019 гг.

Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано в 2018 г. в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки высшего профессионального образования «Пушкинский государственный естественно-научный институт» (история и философия науки, иностранный язык, микробиология) и 2019 г. в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (биотехнология).

Научный руководитель – доктор биологических наук Донова Марина Викторовна, главный научный сотрудник лаборатории микробиологической трансформации органических соединений Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

По результатам рассмотрения диссертации Пошехонцевой В.Ю. «Биосинтез макроциклического поликетиды такролимуса штаммами *Streptomyces tsukubaensis*» принято следующее заключение: диссертационная работа является научно-квалификационной работой, которая посвящена исследованию особенностей биосинтеза такролимуса штаммами бактерий рода *Streptomyces* и разработке эффективного биотехнологического способа его получения. По совокупности представленных результатов диссертационная работа может быть классифицирована как существенное научное достижение в области биотехнологии.

Актуальность темы диссертационной работы Пошехонцевой В.Ю. обусловлена важностью разработки эффективных способов получения иммуносупрессорных агентов нового поколения, в том числе такролимуса, являющегося одним из наиболее востребованных в медицинской практике, для биотехнологии, прикладной микробиологии и биомедицины. Такролимус синтезируется небольшим количеством штаммов актинобактерий рода *Streptomyces* и используется в хирургической практике для предотвращения отторжения чужеродных органов и тканей при их пересадке, в терапии

атипичных дерматитов, аутоиммунных заболеваний; подавляет активность различных бактерий, дрожжей, паразитов и грибов; перспективен для применения в терапии злокачественных опухолей. Низкий уровень биосинтетической активности, ее недостаточная стабильность у ряда штаммов-продуцентов, выраженная диссоциация и фенотипическая изменчивость, окислительная деградация такролимуса на завершающих этапах биосинтеза, образование нежелательных побочных продуктов, обуславливающее низкую эффективность процедуры выделения и очистки конечного продукта, в настоящее время являются главными проблемами, препятствующими эффективному практическому получению этого макролида. В представленной работе были проведены поиск и исследование новых микробных продуцентов такролимуса, на их основе разработан эффективный способ получения такролимуса.

Научная новизна проведенных исследований обусловлена получением новых данных, расширяющих представления об особенностях продуцентов такролимуса, которые могут быть востребованы при разработке технологии его производства. С использованием подходов полифазной таксономии охарактеризованы два новых такролимус-продуцирующих штамма стрептомицетов – *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и *S. tsukubensis* Т60; показаны преимущества *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д в качестве продуцента такролимуса. Расшифрован полный геном *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и выявлено наличие кластера из 26 генов биосинтеза такролимуса, так называемого кластера «с полным набором генов». Изучена фенотипическая изменчивость штамма и определен колониально-морфологический вариант, обеспечивающий высокий уровень продукции такролимуса. Определены критерии селекции высокопродуктивных диссоциантов данного штамма и выявлены условия их поддержания в стабильно активном состоянии. Впервые установлен эффект стимуляции биосинтеза такролимуса у стрептомицетов клетками низших эукариотов (дрожжей и мицелиальных грибов), содержащих в клеточной стенке глюканы, маннаны, и хитин. Выявлены условия культивирования и биосинтеза, обеспечивающие максимальный уровень образования целевого поликетида. Впервые изучено влияние высоко- и низкомолекулярных крахмалов различной структуры на биосинтез такролимуса и найдены условия, обеспечивающие повышение его выхода в условиях периодического культивирования с подпиткой. Изучено влияние полимерных сорбентов различного типа и показаны преимущества бромированного стирол-дивинилбензольного сорбента, обеспечивающего повышение эффективности биосинтеза за счет снижения нежелательной деструкции такролимуса, а также упрощения процедуры его выделения из культуральной среды. С применением

оригинального метода получен кристаллический продукт высокой степени очистки, по качественным показателям соответствующий требованиям современной фармакопеи.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов обусловлена тем, что штамм *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и разработанная на его основе биотехнология могут быть рекомендованы в качестве основы для промышленного получения высоковостребованной фармацевтической субстанции такролимуса по технологии полного цикла. Результаты исследования генома *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д могут быть использованы для получения новых продуцентов с улучшенными биосинтетическими возможностями. Предложенные методы и подходы могут быть применены также в биосинтетических процессах производства других высоковостребованных поликетидов (рапамицина, аскомицина и др.). Полученные результаты вносят вклад в понимание физиологических особенностей стрептомицетов, продуцирующих макроциклические поликетиды, и факторов, способствующих их максимальной продукции в процессах биосинтеза.

Личное участие соискателя в получении результатов заключается в проведении экспериментов с применением микробиологических, цитологических, молекулярно-биологических, биоинформатических методов по изучению физиолого-биохимических, хемотаксономических и генотипических характеристик штаммов стрептомицетов, продуцирующих такролимус, разработке и апробации биотехнологии получения такролимуса с использованием данных штаммов, а также обработке, интерпретации полученных результатов и подготовке публикаций по теме.

Достоверность результатов исследования подтверждается применением в работе современных методов исследований, компьютерных программ для обработки данных и использованием сертифицированного оборудования для измерений.

Ценность научных работ соискателя заключается в том, что в них изложены описания новых продуцентов такролимуса, определены основные факторы, влияющие на эффективность биосинтеза макролида, разработаны способ микробиологического синтеза такролимуса и метод его выделения и очистки до субстанции фармакопейной чистоты.

Основные материалы диссертации опубликованы в 18 печатных работах, из них 7 – в журналах, рекомендованных ВАК и входящих в реферативную базу РИНЦ, международные реферативные базы по научным публикациям WoS и Scopus. Часть научно-технических решений защищена Патентом РФ.

Список публикаций автора по теме диссертационной работы
Публикации в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ
для опубликования результатов диссертационных исследований:

1. **Попехонцева В.Ю.**, Фокина В.В., Суходольская Г.В., Шутов А.А., Донова М.В. Влияние состава крахмала на биосинтез иммунодепрессанта такролимуса (FK-506) штаммом *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д // Прикладная биохимия и микробиология. – 2019. – Т. 55. – № 5. – с. 481-491. (doi: 10.1134/S0555109919040147, РИНЦ, IF = 1,022)
Poshekhontseva V.Yu., Fokina V.V., Sukhodolskay G.V., Shutov A.A., Donova M.V. Effect of starch composition on the biosynthesis of immunosuppressant tacrolimus (FK-506) by *Streptomyces tsukubaensis* VKM Ac-2618D strain // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2019. – V. 55. – № 5. – P. 534-543. (doi: 10.1134/2FS0003683819040148, SCOPUS, WoS, Q3, IF = 1,4)
2. **Poshekhontseva V.Y.**, Bragin E.Y., Fokina V.V., Shtratnikova V.Y., Starodumova I.P., Tarlachkov S.V., Donova M.V. Draft Genome Sequence of FK506-Producing *Streptomyces tsukubensis* Strain VKM Ac-2618D // Microbiology Resource Announcements. – 2019. – V. 8. – № 24. – e00510-19 (doi: 10.1128/MRA.00510-19, SCOPUS, WoS, Q4, IF = 1,7)
3. **Попехонцева В.Ю.**, Фокина В.В., Суходольская Г.В., Шутов А.А., Донова М.В. Влияние низших грибов на биосинтез такролимуса (FK-506) штаммом *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д // Биотехнология. – 2019. – Т. 35. – № 5. – С. 42-50. (doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-42-50, РИНЦ, SCOPUS, Q4, IF = 0,56)
Poshekhontseva V.Yu., Fokina V.V., Sukhodolskay G.V., Shutov A.A., Donova M.V. Study of the effect of lower eukaryotes on tacrolimus (FK-506) biosynthesis by the *Streptomyces tsukubensis* strain VKM Ac-2618D // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2020. – V. 56. – № 8. – P. 847-853. (doi: 10.1134/S0003683820080062, SCOPUS, WoS, Q3, IF = 1,4)
4. Салионов Д.С., **Попехонцева В.Ю.**, Фокина В.В., Шутов А.А., Николаева В.М., Васияров Г.Г., Титова Е.В., Карасев В.С., Староверов С.М., Донова М.В. Разработка способа выделения и очистки такролимуса, синтезированного актинобактериями *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56. – № 6. – 602-611. (doi: 10.31857/S055510992006015X, РИНЦ, IF = 1,022)
Salionov D.S., Poshekhontseva V.Yu., Fokina V.V., Shutov A.A., Nikolaeva V.M., Vasiarov G.G., Titova E.V., Karasev V.S., Staroverov S.M., Donova M.V. Biosynthesis of tacrolimus by the *Streptomyces tsukubensis* VKM Ac-2618D strain in the presence of polymeric sorbents and development of a method for its isolation and purification // Applied

- Biochemistry and Microbiology. – 2020. – V. 56. – № 6. – P. 699-707. (doi: 10.1134/S0003683820060150; SCOPUS, WoS, Q3, IF = 1,4)
5. **Попехонцева В.Ю.**, Фокина В.В., Тарлачков С.В., Мачулин А.В., Шутов А.А., Донова М.В. *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д – эффективный продуцент такролимуса // Биотехнология. – 2021. – Т. 37. – № 1. – С. 30-40. (doi: 10.21519/0234-2758-2021-37-1-30-40, РИНЦ, SCOPUS, Q4, IF = 0,56)
 6. **Попехонцева В.Ю.**, Суходольская Г.В., Гулевская С.А., Фокина В.В., Донова М.В. Таксономия такролимус (FK506)-синтезирующего штамма *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и влияние компонентов среды на активность продуцента // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18). – № 2 (1). – С. 746-748. (РИНЦ, IF = 0,67)
 7. **Попехонцева В.Ю.**, Суходольская Г.В., Фокина В.В., Гулевская С.А., Донова М.В. Естественная изменчивость *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д и селекция высокоактивного продуцента такролимуса (FK506) // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18). – № 2 (1). – С. 749-750. (РИНЦ, IF = 0,67)

Публикации в других журналах и сборниках трудов и материалов

научных конференций:

1. **Попехонцева В.Ю.**, Гулевская С.А., Донова М.В. Сравнительное изучение фено- и генотипических характеристик и идентификация штаммов *Streptomyces* spp. – продуцентов такролимуса // Журнал научного фонда «Биолог». – 2014. – № 3. – С. 119-122.
2. **Попехонцева В.Ю.**, Гулевская С.А., Суходольская Г.В., Фокина В.В., Шутов А.А., Донова М.В. Дифференциальная характеристика стрептомицетов-продуцентов такролимуса // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов». – Москва, 2014. – С. 188.
3. **Попехонцева В.Ю.**, Гулевская С.А., Суходольская Г.В., Фокина В.В. Влияние крахмала на биосинтез такролимуса (FK-506) штаммом *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д // Материалы 19-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2015. – С. 39.
4. **Попехонцева В.Ю.**, Суходольская Г.В., Фокина В.В., Гулевская С.А., Лобастова Т.Г., Шутов А.А., Донова М.В. Биосинтез такролимуса актинобактериями рода *Streptomyces* и селекция высокоактивного морфотипа штамма-продуцента // Материалы II Пущинской школы-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». – Пущино, 2015. – С. 85-87.

5. **Попехонцева В.Ю.** Оптимизация микробиологического синтеза такролимуса актинобактериями рода *Streptomyces* // Материалы Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2016»: секция «Биология». – Москва, 2016. – С. 258-259.
6. **Попехонцева В.Ю.,** Фокина В.В., Суходольская Г.В., Шутов А.А., Донова М.В. Оптимизация этапа получения посевной культуры при масштабировании технологии получения такролимуса (FK-506) // Материалы 20-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2016. – С. 237.
7. **Попехонцева В.Ю.,** Фокина В.В., Шутов А.А., Донова М.В. Влияние состава крахмалосодержащего сырья на биосинтез такролимуса (FK-506) штаммом *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д // Материалы XI Молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии». – Москва, 2016. – С. 115-118.
8. **Попехонцева В.Ю.,** Фокина В.В., Шутов А.А., Донова М.В. Влияние клеток и клеточных компонентов низших эукариот на биосинтез такролимуса культурой *Streptomyces tsukubaensis* // Материалы III Пущинской школы-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». – Пущино, 2016. – С. 113-116.
9. **Попехонцева В.Ю.,** Фокина В.В., Салионов Д.С., Шутов А.А., Донова М.В. Создание прототипа технологии микробиологического синтеза такролимуса // Материалы I Российского Микробиологического конгресса. – Пущино, 2017. – С. 166-167.
10. **Попехонцева В.Ю.,** Фокина В.В., Салионов Д.С., Шутов А.А., Донова М.В. Получение фармацевтической субстанции такролимуса: полный цикл биосинтеза и очистки // Материалы IV Пущинской школы-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». – Пущино, 2017. – С.88-90.

Интеллектуальная собственность:

1. **Попехонцева В.Ю.,** Фокина В.В., Шутов А.А., Донова М.В. Штамм актиномицета *Streptomyces tsukubensis* – продуцент такролимуса и способ получения такролимуса. Патент РФ 2722699 С1, 2020.

Основные результаты диссертации были представлены на российских и международных конференциях: Всероссийском симпозиуме с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, Россия, 2014), II Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Современные проблемы микробиологии, иммунологии и биотехнологии» (Пермь,

Россия, 2015), Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2016» (Москва, Россия, 2016), 19-й и 20-й Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, Россия, 2015; 2016), II, III и IV Пущинской школе-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Пущино, Россия, 2015; 2016; 2017), I Российском Микробиологическом конгрессе (Пущино, 2017), стендовых конференциях молодых ученых ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН (Пущино, Россия, 2014; 2015), в рамках проекта «УМНИК» (Пущино, 2017-2019) и государственного задания (№0114-2018-0004).

Диссертационная работа Пошихонцевой В.Ю. соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями, опубликованными в Постановлениях Правительства РФ от 24.04.2016 г. № 335, от 02.06.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168).

Диссертация Пошихонцевой В.Ю. соответствует п. 3 (Изучение и разработка технологических режимов выращивания микроорганизмов-продуцентов, культур тканей и клеток растений и животных для получения биомассы, ее компонентов, продуктов метаболизма, направленного биосинтеза биологически активных соединений и других продуктов, изучение их состава и методов анализа, технико-экономических критериев оценки, создание эффективных композиций биопрепаратов и разработка способов их применения), п. 4 (Изучение и разработка процессов и аппаратов микробиологического синтеза, включая физико-химическую кинетику, гидродинамику, массо- и теплообмены в аппаратах для ферментации, сгущение биомассы, разделения клеточных суспензий, сушки, грануляции, экстракции, выделения, фракционирования, очистки, контроля и хранения конечных целевых продуктов. Разработка теории моделирования, оптимизации и масштабирования процессов и аппаратов микробиологического синтеза), п. 7 (Разработка новых технологических процессов на основе микробиологического синтеза, биотрансформации, биокатализа, иммуносорбции, биодеструкции, биоокисления и создание систем биокомпостирования различных отходов, очистки техногенных отходов (сточных вод, газовых выбросов и др.), создание замкнутых технологических схем микробиологического производства, последние с учетом вопросов по охране окружающей среды) Паспорта научной специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Диссертация «Биосинтез макроциклического поликетиды такролимуса штаммами *Streptomyces tsukubaensis*» Пошихонцевой Вероники Юрьевны рассмотрена на совместном

семинаре лаборатории микробиологической трансформации органических соединений ИБФМ РАН, лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН и лаборатории биосинтеза ферментов ИБФМ РАН 23 марта 2020 г. и рекомендована к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Заключение принято на заседании Ученого Совета Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН), обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН). На заседании присутствовал 21 человек. Результаты голосования: «за» – 21, «против» – 0, «воздержалось» – 0, протокол № 3 от «11» декабря 2020 г.

Ведущий научный сотрудник

лаборатории биологии плазмид

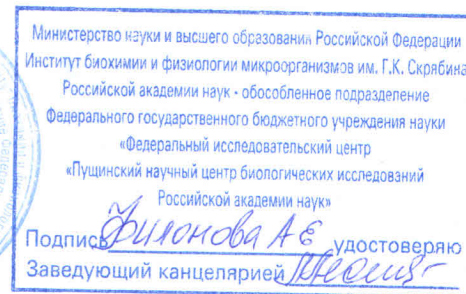
Института биохимии и физиологии микроорганизмов

им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук,

обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки

«Федеральный исследовательский центр

«Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»,



д.б.н.

Филонов Андрей Евгеньевич

Заведующий лаборатории биосинтеза ферментов

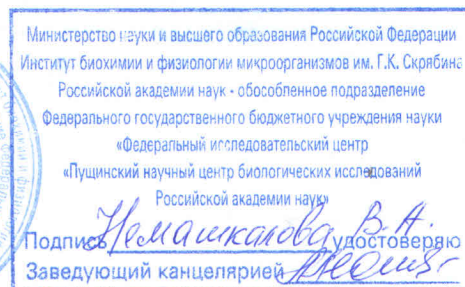
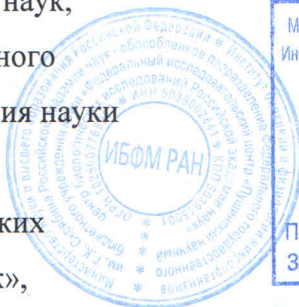
Института биохимии и физиологии микроорганизмов

им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук,

обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки

«Федеральный исследовательский центр

«Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»,



к.б.н.

Немашкалов Виталий Алексеевич