

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)
УДК 577.17.083:175.322
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2019-55-2-182-187>

Поступила в редакцию 26.11.2018
Received 26.11.2018

А. М. Горькавая, А. А. Гилеп, Г. В. Сергеев

Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ, ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ И ПОЛУЧЕНИЕ СОМАТОТРОПИНА ЧЕЛОВЕКА

Аннотация. Соматотропин – гормон пептидной природы, синтезирующийся в передней доле гипофиза и усиливающий пролиферацию клеток и рост организма. В результате проведенного исследования разработана конструкция для периплазматической экспрессии рекомбинантного соматотропина человека на основе плазмиды pNic, подобраны условия для периплазматической бактериальной экспрессии (42 ч, 30 °С), способы выделения и очистки препарата целевого белка, не содержащего гистидинового кластера. Получен препарат целевого белка высокой степени очистки и соответствующего природному по молекулярной массе (MW 22301,9 Да). Общее количество полученного рекомбинантного соматотропина человека составило 2,85 мг на литр среды.

Ключевые слова: соматотропин, рекомбинантный белок, бактериальная экспрессия, периплазматическая экспрессия, *E. coli*

Для цитирования. Горькавая, А. М. Молекулярное клонирование, гетерологическая экспрессия и получение соматотропина человека / А. М. Горькавая, А. А. Гилеп, Г. В. Сергеев // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2019. – Т. 55, № 2. – С. 182–187. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2019-55-2-182-187>

A. M. Gorkavaya, A. A. Gilep, G. V. Sergeev

Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

MOLECULAR CLONING, HETEROLOGICAL EXPRESSION AND PRODUCTION OF THE HUMAN GROWTH HORMONE

Abstract. Growth hormone (GH) is a polypeptide produced in the anterior pituitary lobe that triggers different biochemical pathways and increases cell proliferation and growth. In this work, the pNic based vector for periplasmic secretion was developed. Recombinant human growth hormone was produced via periplasmic secretion (42h, 30 °C) followed by several steps of purification. GH obtained does not contain His-tag. Expression level of 2,85 mg per 1 liter of bacterial culture was achieved.

Keywords: Growth hormone, recombinant protein, bacterial expression, periplasmic secretion, *E. coli*

For citation: Gorkavaya A. M., Gilep A. A., Sergeev G. V. Molecular cloning, heterological expression and production of the human growth hormone. *Vestsi Natsyonal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2019, vol. 55, no. 2, pp. 182–187 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2019-55-2-182-187>

Введение. Соматотропин – гормон пептидной природы, синтезирующийся в передней доле гипофиза и усиливающий пролиферацию клеток и рост организма. У высших позвоночных ген, кодирующий гормон роста, состоит из пяти экзонов и четырех интронов. Существует несколько изоформ соматотропина человека, наиболее распространенная – с молекулярной массой 22 кДа, состоящая из 191 аминокислотного остатка и содержащая две дисульфидные связи [1–3].

Существуют различные подходы к получению рекомбинантных белков методом бактериальной экспрессии. При цитозольной экспрессии под сильным промотором многие белки, накапливаясь в цитоплазме, формируют тельца включения, что приводит к необходимости довольно длительной процедуры солюбилизации и рефолдинга, который не всегда является успешным и снижает выход нативного продукта. Этого можно избежать путем добавления бактериального сигнального пептида к N-концевой последовательности синтезируемого белка. В этом случае рекомбинантные белки могут проходить через мембрану и накапливаться в периплазматическом пространстве клеток *E. coli* в нативной форме. После транспортировки белка в периплазму сигнальный пептид отщепляется лидерной пептидазой, локализованной на внутренней мембране

клетки [4, 5]. Существует ряд преимуществ периплазматической экспрессии рекомбинантных ферментов: белок синтезируется в активной форме и его накопление происходит в периплазме, что позволяет облегчить его последующие выделение и очистку. Дисульфидные оксидоредуктазы и изомеразы, локализованные в периплазме *E. coli*, катализируют формирование дисульфидных мостиков, обеспечивая накопление нативных и растворимых белковых продуктов и делая периплазматическую экспрессию идеальным способом для получения ряда терапевтических белков, в том числе гормонов роста [6–10].

При получении рекомбинантных белков человека, таких как соматотропин, важно максимальное соответствие их природной форме, т. е. без дополнительных фрагментов, которые могут вводиться для облегчения процедуры выделения и очистки (например His-tag кластер).

Материалы и методы исследования. Реагенты. Были использованы реактивы следующих фирм-производителей: LB среда; TB среда (Fluka, США); канамицин (Kan), IPTG, гистидин, бромфеноловый синий, β -меркаптоэтанол (Sigma, США); Tris Base, фенолметилсульфонилфторид (ФМСФ, PMSF), NaCl и глицерин (Acros organics, Германия); Ni-NTA агароза (Qiagen, США); SDS (sodium dodecyl sulfate), акриламид, TEMED и персульфат аммония (USB, США); In-Fusion HD Cloning Kit (ClonTech, США).

Конструирование экспрессионного вектора для периплазматической экспрессии соматотропина человека в клетках *E. coli*. При создании конструкции для периплазматической экспрессии соматотропина человека использовался вектор pNis, содержащий лидерный пептид pelB, 10 His-Tag, сайт узнавания TEV-протеазы, сайт для LIC-клонирования и ген устойчивости к канамицину.

Последовательность, кодирующая соматотропин человека, вводилась при помощи LIC-клонирования с использованием набора In-Fusion HD Cloning Kit.

Полученной готовой конструкцией трансформировали клетки *E. coli* (*DH5 α* и *BL21*). Нуклеотидная последовательность полученной плазмидной конструкции была проверена при помощи секвенирования. Постановку реакции секвенирования осуществляли, используя набор BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Секвенирование каждого образца проводили с прямым и обратным праймерами. Сиквенс-продукты очищали, используя набор Applied Biosystems BigDye X Terminator Purification Kit. Анализ сиквенс продуктов проводили на приборе Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (POP7 polymer, capillary length 36 cm).

Периплазматическая экспрессия соматотропина в клетках *E. coli*. Ночную культуру клеток *E. coli* *BL21* (*DE3*), содержащую плазмиду pNis-HGH, разводили 1:200 TB-средой, содержащей 35 мкг/мл Kan, и инкубировали в течение 3,5 ч при температуре 37 °C и интенсивности перемешивания 180 об./мин. Индукцию белкового синтеза осуществляли добавлением IPTG до конечной концентрации 0,5 мМ. Экспрессию осуществляли 42 ч при температуре 30 °C и интенсивности перемешивания 160 об./мин. Целевой белок выделяли из периплазмы (клетки осаждали центрифугированием, затем ресуспендировали в буфере, содержащем 200 мМ Трис-НСI (pH 8,0), 0,5 мМ EDTA, 500 мМ сахарозу, 0,1 мМ PMSF и 1 мг/мл лизоцима, инкубировали с перемешиванием в течение часа, затем снова осаждали центрифугированием и отбирали супернатант – периплазматическую фракцию), затем очищали на колонке с Ni-NTA агарозой. Промывку колонки осуществляли буфером, содержащим 50 мМ Трис-НСI (pH 8,0), 0,3 М NaCl и 50 мМ имидазол, а элюцию белка с колонки – 50 мМ Трис-НСI буфером (pH 8,0), содержащим 0,3 М NaCl и 500 мМ имидазол и 20 % глицерин.

Анализ молекулярной массы белков методом масс-спектрометрии осуществляли на настольном MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex LRF system («Bruker Daltonik GmbH», Германия). Контроль чистоты полученных белковых препаратов осуществляли с помощью гель-электрофореза в 15 %-ном ПААГ в присутствии Ds-Na методом U. K. Laemmli на приборе Mini Protean II («Bio-Rad», США).

Аналитическая экспрессия соматотропина в клетках *E. coli*. Ночную культуру клеток *E. coli* *BL21* (*DE3*) разводили 1:200 TB-средой, содержащей 50 мкг/мл Kan, и инкубировали в течение 3,5 ч при температуре 37 °C и интенсивности перемешивания 180 об./мин. Индукцию белкового синтеза осуществляли добавлением IPTG до конечной концентрации 0,5 мМ. Экспрессию

осуществляли в течение 4, 12 и 24 ч при температурах 37, 30 и 22 °С и интенсивности перемешивания 180 об./мин. Анализ экспрессии целевого белка проводили методом Вестерн блоттинга на приборе Bio-Rad Trans-Blot turbo transfer system.

Периплазматическая экспрессия соматотропина в клетках *E. coli* (альтернативные комбинации условий). 1. Ночную культуру клеток *E. coli* BL21 (DE3) разводили 1:200 ТВ-средой, содержащей 50 мкг/мл Кап, и инкубировали в течение 3,5 ч при температуре 37 °С и интенсивности перемешивания 150 об./мин. Индукцию белкового синтеза осуществляли добавлением IPTG до конечной концентрации 0,5 мМ. Экспрессию осуществляли в течение 4 ч при температуре 37 °С и интенсивности перемешивания 140 об./мин. Целевой белок выделяли из периплазмы, затем очищали на колонке с Ni-NTA агарозой. Промывку колонки осуществляли буфером, содержащим 50 мМ Трис-НСI (рН 8,0), 0,3 М NaCl и 50 мМ имидазол, а элюцию белка с колонки – 50 мМ Трис-НСI буфером (рН 8,0), содержащим 0,3 М NaCl и 500 мМ имидазол и 20 % глицерин.

2. Ночную культуру клеток *E. coli* BL21 (DE3) разводили 1:200 ТВ-средой, содержащей 50 мкг/мл Кап, и инкубировали в течение 3,5 ч при температуре 37 °С и интенсивности перемешивания 150 об./мин. Индукцию белкового синтеза осуществляли добавлением IPTG до конечной концентрации 0,5 мМ. Экспрессию осуществляли в течение 42 ч при температуре 16 °С и интенсивности перемешивания 140 об./мин. Целевой белок выделяли из периплазмы, затем очищали на колонке с Ni-NTA агарозой. Промывку колонки осуществляли буфером, содержащим 50 мМ Трис-НСI (рН 8,0), 0,3 М NaCl и 50 мМ имидазол, а элюцию белка с колонки – 50 мМ Трис-НСI буфером (рН 8,0), содержащим 0,3 М NaCl и 500 мМ имидазол и 20 % глицерин.

Отщепление остатков гистидина у рекомбинантного соматотропина осуществляли при помощи обработки TEV-протеазой (в соотношении к белку 1:100 в присутствии 0,5 мМ EDTA) с последующей очисткой целевого белка от отщепленных фрагментов и TEV-протеазы пропусканием через колонку с Ni-NTA агарозой.

Результаты исследования и их обсуждение. С целью получения целевого продукта высокого качества, облегчения очистки и выделения был использован метод периплазматической экспрессии в клетках *E. coli*, ранее определенный нами [9] как наиболее оптимальный для получения рекомбинантного соматотропина *Gallus gallus*.

Разработанная нами конструкция (рис. 1) на основе плазмиды pNis позволяет синтезировать полипептид, содержащий в своем составе зрелую форму соматотропного гормона с лидерной последовательностью pelB в N-концевой последовательности. Данный полипептид в клетках *E. coli* транспортируется в периплазматическое пространство, где происходит отщепление лидерного сигнала и накопление конечного продукта. Это позволяет избежать синтеза белка в тельца включения, использования мочевины в ходе выделения и не всегда успешной процедуры рефолдинга целевого белка.

В N-концевую область соматотропина включены 10 остатков гистидина (10 His-tag) для обеспечения его связывания при очистке на колонке с Ni-NTA агарозой. Использование 10 His-tag вместо 6 His-tag позволяют применять более высокие концентрации гистидина при промывке, что обеспечивает более качественную очистку соматотропина. Между 10 His-tag и N-концом последовательности целевого нативного белка размещен сайт узнавания TEV-протеазы. Итоговая конструкция была получена при помощи LIC-клонирования с использованием набора In-Fusion HD Cloning Kit.

Нуклеотидная последовательность полученной плазмидной конструкции была подтверждена секвенированием. Анализ данных секвенирования показал,

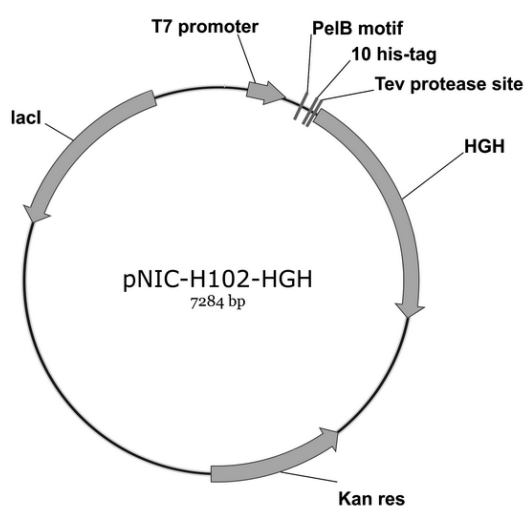


Рис. 1. Векторная конструкция для периплазматической экспрессии рекомбинантного соматотропина человека

Fig. 1. Vector construction for periplasmic expression of recombinant human growth hormone.

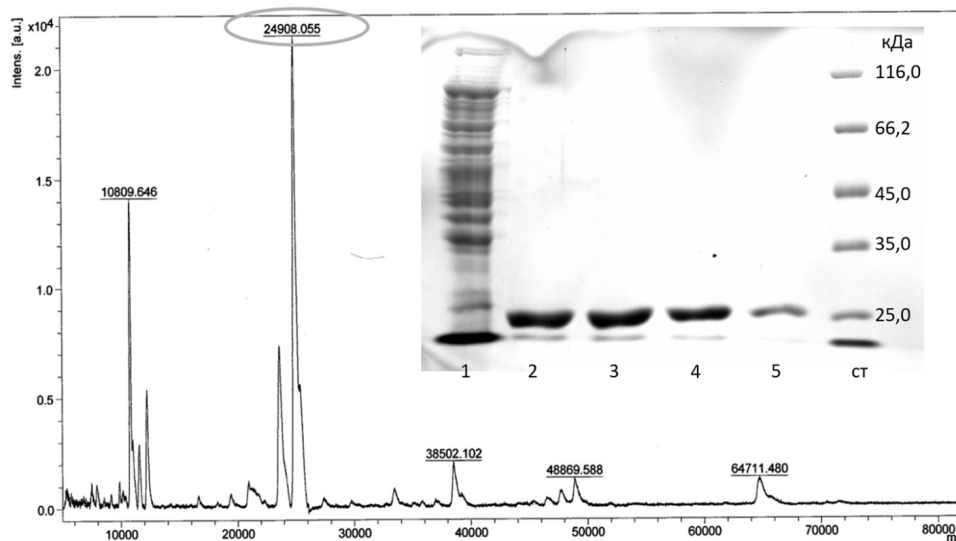


Рис. 2. Масс-спектр рекомбинантного соматотропина человека. Молекулярная масса соматотропина человека, содержащего в N-концевом участке 10 остатков гистидина и сайт узнавания TEV протеазы (7 аминокислотных остатков) составляет 24382 Да. На вставке приведены результаты электрофореза в 15 % ПААГ (в присутствии SDS). 1 – периплазматическая фракция до выделения белка, 2–5 фракции, собранные при элюции, ст – маркер молекулярных масс

Fig. 2. Mass spectrum of recombinant human growth hormone. The molecular mass of human growth hormone containing 10 histidine residues in the N-terminal region and the TEV protease recognition site (7 amino acid residues) is 24,382 Da. The inset shows the results of electrophoresis in 15 % PAAG (in the presence of SDS). 1 – periplasmic fraction prior to isolation of the protein, 2–5 fractions collected during elution, ст – molecular mass marker

что аминокислотная последовательность кодируемого белка соответствует последовательности соматотропина человека. При этом кодоны, которые не характерны для бактериального генома, были заменены на кодоны, тРНК которых широко представлены в транскрипционном аппарате бактериальной клетки.

Далее была проведена препаративная бактериальная экспрессия (42 ч, 30 °С – комбинация условий выбрана исходя из предыдущего опыта [9]) с последующим выделением периплазматических белков и очисткой целевого продукта на колонке с Ni-NTA агарозой. Анализ полученных фракций проводился методом ПААГ-электрофореза и масс-спектрометрии (рис. 2).

Общее количество выделенного рекомбинантного соматотропина составило 3,6 мг на литр культуральной среды. Далее His-tag был отщеплен при помощи обработки TEV-протеазой с последующей очисткой на колонке с Ni-NTA агарозой. Для этого полученную после окончания реакции смесь, содержащую TEV-протеазу, рекомбинантный соматотропин и отщепленные фрагменты, пропускали через небольшую (1 мл) колонку с Ni-NTA агарозой. Отщепленные фрагменты с His-tag и TEV-протеаза (также содержащая гистидиновый кластер) при этом связываются с колонкой, а соматотропин, более не содержащий His-tag, свободно проходит через нее. Этот этап также позволяет дополнительно очистить препарат от примесей, имеющих довольно высокое связывание с колонкой и не устранимых при промывке. Был получен целевой белковый продукт высокой степени очистки, не содержащий His-tag (рис. 3).

С целью увеличения выхода целевого белка была проведена дополнительная аналитическая экспрессия. Полученные образцы проанализированы методом Вестерн-блоттинга с анти-His антителами. При повышении температуры (в ряду 22, 30 и 37 °С) количество белка возрастало, при увеличении времени экспрессии значительных изменений не наблюдалось. Также было обнаружено, что рекомбинантный соматотропин начинает в значительной степени расщепляться в клетках и, следовательно, не накапливаться при длительной экспрессии. Наиболее оптимальной выбрана стратегия быстрой экспрессии (4 ч, 37 °С). Однако при использовании этого метода препаративной экспрессии белок из периплазматического пространства получен не был. Предположительно высокий уровень экспрессии, обусловленный сильным промотором, приводит к накоплению избытка целевого белка в цитоплазме, что обуславливает его наличие на электрофорограмме при Вестерн-блоттинге. Но в периплазму белок поступает в крайне малом количестве.

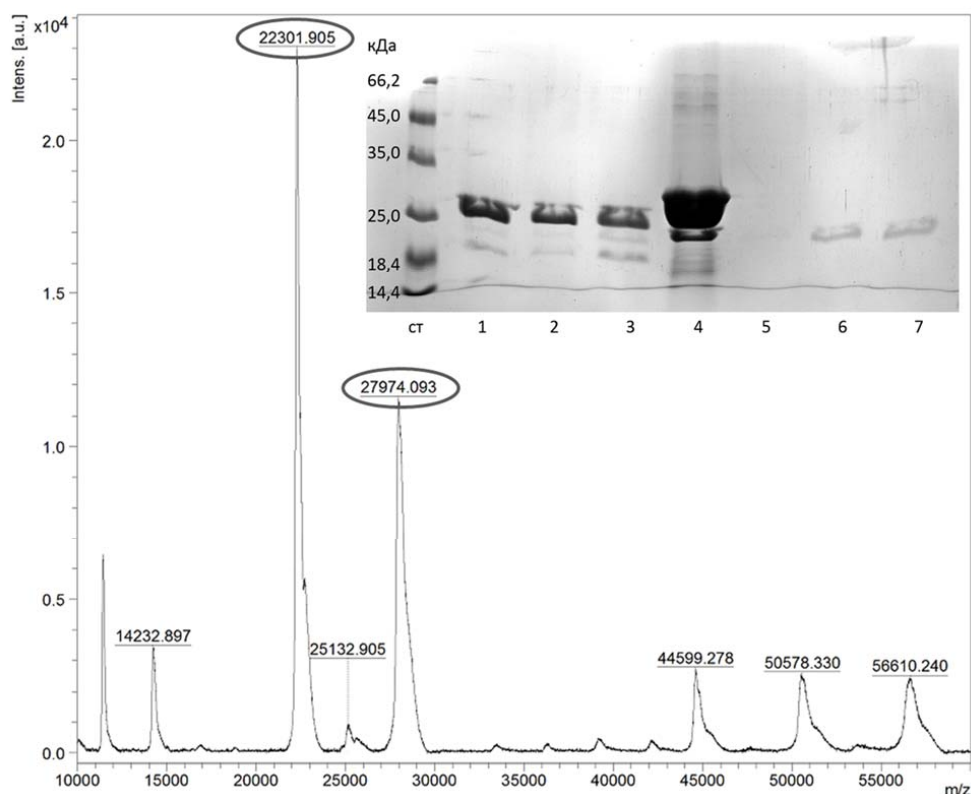


Рис. 3. Масс-спектр обработанного TEV протеазой рекомбинантного соматотропина человека. Молекулярная масса зрелого соматотропина человека 22 кДа, изоформы – 22129 Да. Молекулярная масса TEV протеазы около 28 кДа. На вставке приведены результаты электрофореза в 15 % ПААГ (в присутствии SDS). 1, 2 – фракции, собранные при элюции; 3 – фракция после диализа; 4 – реакционная смесь с TEV после прохождения реакции; 5–7 – фракции после обработки TEV и очистки на Ni-NTA агарозе; ст – маркер молекулярных масс

Fig. 3. Mass spectrum of human growth hormone treated with TEV protease. The molecular mass of mature human growth hormone is 22 kDa, of the isoform – 22129 Da. The molecular weight of the TEV protease is about 28 kDa. The inset shows the results of electrophoresis in 15 % PAAG (in the presence of SDS). 1, 2 – fractions collected during elution, 3 – fraction after dialysis, 4 – reaction mixture with TEV after passing the reaction, 5–7 – fractions after treatment with TEV and purification on Ni-NTA agarose, ст – molecular mass marker

Исходя из этого предположения была проведена экспрессия 42 ч при температуре 16 °С. Предположительно низкая температура должна была снизить уровень синтеза белка, что позволило бы ему свободно выходить в периплазматическое пространство. Однако этим способом целевой белок также не был получен в значимом количестве.

Исходя из результатов проведенных исследований, сделан вывод, что при периплазматической экспрессии с использованием конструкции на основе плазмиды pNis значимое количество рекомбинантного соматотропина человека можно получить при длительности экспрессии после индукции 42 ч при температуре 30 °С.

Заключение. В результате проведенного исследования разработана конструкция для периплазматической экспрессии рекомбинантного соматотропина человека на основе плазмиды pNis, подобраны условия для периплазматической бактериальной экспрессии (42 ч, 30 °С), способы выделения и очистки препарата целевого белка, не содержащего гистидинового кластера.

Получен препарат целевого белка высокой степени очистки и соответствующего природному по молекулярной массе (MW 22301,9 Да). Общее количество полученного рекомбинантного соматотропина человека составило 2,85 мг на литр среды.

Благодарности. Работа была представлена на Международной научной конференции «Молодежь в науке – 2018», которая проходила в Минске с 29 октября по 1 ноября 2018 года.

Acknowledgements. This work was presented at the International Scientific Conference «Youth in Science – 2018», which was held in Minsk from October 29th to November 1st 2018.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- Lewis, U. J. Structure and Properties of Members of the hGH Family: A Review / U. J. Lewis, Y. N. Sinha, G. P. Lewis // *Endocrine Journal*. – 2000. – Vol. 47. – P. 1–8. https://doi.org/10.1507/endocrj.47.supplmarch_sl
- Lindholm, J. Growth hormone: Historical notes / J. Lindholm // *Pituitary*. – 2006. – Vol. 9, No 1. – P. 5–10. <https://doi.org/10.1007/s11102-006-7557-4>
- Growth hormone isoforms and segments/fragments: Molecular structure and laboratory measurement / E. F. De Palo [et al.] // *Clinica Chimica Acta*. – 2006. – Vol. 364. – P. 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.06.009>
- Dalbey, R. E. Leader peptidase / R. E. Dalbey // *Molecular Microbiology*. – 1991. – Vol. 5, No 12. – P. 2855–2860. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb01844.x>
- Paetzel, M. Structure and mechanism of *Escherichia coli* type I signal peptidase / M. Paetzel // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2014. – Vol. 1843. – P. 1497–1508.
- Sokolosky, J. T. Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone / J. T. Sokolosky, F. C. Szoka // *Protein Expression and Purification*. – 2013. – Vol. 87, No. 2. – P. 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.11.002>
- High-level expression and purification of recombinant human growth hormone produced in soluble form in *Escherichia coli* / Z. Levarski [et al.] // *Protein Expression and Purification*. – 2014. – Vol. 100. – P. 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.05.003>
- Chang C. N., Rey M., Bochner B., Heyneker H., Gray G. High-level secretion of human growth hormone by *Escherichia coli* / C. N. Chang [et al.] // *Gene*. – 1987 – Vol. 55, No 2–3. – P. 189–196. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90279-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90279-4)
- Горькавая, А. М. Молекулярное клонирование, гетерологическая экспрессия и получение рекомбинантного соматотропина *G. Gallus* / А. М. Горькавая, Г. В. Сергеев, А. А. Гилеп // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2016. – № 2. – P. 76–82.

References

- Lewis U. J., Sinha Y. N., Lewis G. P. Structure and Properties of Members of the hGH Family: A Review. *Endocrine Journal*, 2000, vol. 47, pp. 1–8. https://doi.org/10.1507/endocrj.47.supplmarch_sl
- Lindholm J. Growth hormone: Historical notes. *Pituitary*, 2006, vol. 9, no. 1, pp. 5–10. <https://doi.org/10.1007/s11102-006-7557-4>
- De Palo E. F., De Filippis V., Gatti R., Spinella P. Growth hormone isoforms and segments/fragments: Molecular structure and laboratory measurement. *Clinica Chimica Acta*, 2006, vol. 364, pp. 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.06.009>
- Dalbey R.E. Leader peptidase. *Molecular Microbiology*, 1991, vol. 5, no.12, pp. 2855–2860. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb01844.x>
- Paetzel M. Structure and mechanism of *Escherichia coli* type I signal peptidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, vol. 1843, pp. 1497–1508.
- Sokolosky J.T., Szoka F. C. Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone. *Protein Expression and Purification*, 2013, vol. 87, no. 2, pp. 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.11.002>
- Levarski Z., Šoltyšová A., Krahulec J., Stuchlík S., Turn'a J. High-level expression and purification of recombinant human growth hormone produced in soluble form in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2014, vol. 100, pp. 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.05.003>
- Chang C. N., Rey M., Bochner B., Heyneker H., Gray G. High-level secretion of human growth hormone by *Escherichia coli*. *Gene*, 1987, vol. 55, no. 2–3, pp. 189–196. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90279-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90279-4)
- Gorkavaya A. M., Sergeev G. V., Gilep A. A. Molecular cloning, heterologous expression and production of the recombinant *G. Gallus* growth hormone. *Vesti Natsyonal'nai akademii nauk Belarusi. Seriya khimichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2016, no. 2, pp. 76–82 (in Russian).

Информация об авторах

Горькавая Анна Михайловна – науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: annagorkavaya@gmail.com

Гилеп Андрей Александрович – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: agilep@iboch.by

Сергеев Геннадий Валерьевич – канд. хим. наук, зав. лаб., Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: gvserg@iboch.by

Information about the author

Anna M. Gorkavaya – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Science of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: annagorkavaya@gmail.com

Andrei A. Gilep – Ph. D. (Chemistry), Leading researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Science of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: agilep@iboch.by

Gennady V. Sergeev – Ph. D. (Chemistry), Head of the laboratory, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Science of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: gvserg@iboch.by