

*На правах рукописи*

Воробьев Иван Иванович

МЕТОДЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ,  
КОДИРУЮЩИХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ГЛИКОПРОТЕИНЫ

03.01.04 - Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Москва - 2019

Работа выполнена в лаборатории биоинженерии клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук и в лаборатории биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук.

#### **НАУЧНЫЙ КОНСУЛЬТАНТ:**

доктор биологических наук, профессор, академик **Скрябин Константин Георгиевич**

#### **ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:**

**Лаврик Ольга Ивановна**, доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, заведующая лабораторией биоорганической химии ферментов.

**Георгиева Софья Георгиевна**, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук, заведующая лабораторией факторов транскрипции.

**Сергиев Петр Владимирович**, доктор химических наук, Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Кафедра химии природных соединений, отдел структуры и функций РНК, профессор.

#### **ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН

**Защита состоится** \_\_\_\_ \_\_\_\_\_ **20\_\_ г. в** \_\_\_\_ на заседании Совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2. С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат биологических наук

А. Ф. Орловский

## **Общая характеристика работы**

### **Актуальность проблемы:**

Одной из важнейших проблем современной биохимической науки является разработка платформы для получения функционально активных рекомбинантных белков. Установление структурных особенностей генетических конструкций, обеспечивающих механизмы экспрессии генов, а также пути направленной оптимизации элементов этих конструкций находится на пике современной биохимии и тесно связано с нуждами биотехнологии.

Среди центральных биотехнологических задач, решаемых при создании оригинальных и воспроизведенных препаратов рекомбинантных белков для медицинского применения, является создание линий-продуцентов и штаммов-продуцентов, сочетающих максимальную продуктивность и достаточную генетическую стабильность при их последовательной культивации в течение нескольких месяцев. Получение фармацевтически значимых гликопротеинов в абсолютном большинстве случаев предполагает использование культивируемых клеток млекопитающих, в первую очередь линии клеток яичника китайского хомячка (СНО) и ее производных сублиний. В промышленной биофармацевтике для генетической трансформации клеток традиционно используются векторные плазмиды на основе промотора цитомегаловируса CMV и данный подход имеет ряд существенных ограничений, связанных с ограниченной стабильностью функциональных генетических элементов вирусов в геноме культивируемых клеток. В ряде работ рассматриваются возможности замены вирусных промоторов на промоторы генов домашнего хозяйства человека или китайского хомячка, однако существующие решения в данной области обладают многими частными недостатками. Одним из лучших существующих решений можно считать использование полной некодирующей части гена фактора элонгации трансляции 1 альфа (EEF1A1) китайского хомячка в качестве вектора для генов целевых белков. Использование данных генетических элементов позволяет получать панели клональных линий-продуцентов со схожей и относительно высокой удельной продуктивностью, при этом как большинство таких клональных линий, так и исходные поликлональные популяции клеток как правило сохраняют свою удельную продуктивность в течение 2-3 месяцев культивирования в отсутствие селективного давления. Существовавшие к моменту начала настоящей работы плазмидные векторы на основе EEF1A1 китайского хомячка плохо подходили для практического использования из-за очень большого размера плазмид, крайне низкой эффективности инсерции генетических кассет в геном клеток и, предположительно, слабого ответа на попытки их амплификации в геноме под действием возрастающих концентраций селекционного агента метотрексата (MTX).

Следует отметить, что решение задач по получению клеточных линий-продуцентов рекомбинантных белков для медицинского применения подчиняется различной логике для инновационных лекарственных средств и их воспроизведенных аналогов (биодженериков, биоаналогов). Клональные клеточные линии-продуценты белков для инновационных лекарственных средств должны быть получены за минимальное время и должны обеспечивать постоянство свойств целевого белка, то есть одинаковый уровень пост-трансляционных модификаций и сходство структур N- и O-связанных олигосахаридов при различных режимах культивации клеток. Вследствие этого, задачи по максимизации удельной и общей продуктивности клеток оказываются вторичными и многие линии-продуценты оригинальных рекомбинантных белков для медицинского применения обладают удельными продуктивностями, весьма далекими от физиологических возможностей клеток-продуцентов.

При получении линий-продуцентов рекомбинантных белков для воспроизведенных лекарственных средств задачи максимизации удельной и общей продуктивности являются первичными. Секретируемый такими клеточными линиями целевой белок может быть сравнен с уже существующим «оригиналом» и при обнаружении существенных отличий кандидатная клеточная линия может быть отброшена, либо могут быть изменены условия культивирования для восстановления биоэквивалентности воспроизведенного и оригинального белков.

Основной целью настоящей работы являлась разработка оптимальных генетических конструкций для экспрессии генов и методов получения клеточных линий, продуцирующих максимально возможные количества рекомбинантных гликопротеинов для последующего создания на их основе воспроизведенных лекарственных средств. Создание новых генетических конструкций для гетерологической экспрессии биотехнологически важных белков имеет не только прикладное, но и фундаментальное значение. Современные подходы, связанные с дизайном регуляторных последовательностей гена, кодирующего интересующий белок, позволяют существенно повысить уровень экспрессии последнего. Получение линий клеток-продуцентов с существенно бóльшим уровнем секреции биологически активных фармацевтически значимых белков является актуальной практической задачей, результаты решения которой будут востребованы современной биофармацевтикой и могут быть использованы для получения промышленно пригодных систем экспрессии других фармацевтически значимых белков.

В данной работе разрабатываемые генетические конструкции и методы создания клональных клеточных линий были последовательно использованы для разработки

промышленных технологий получения медицински значимых гликопротеидов, а именно факторов свертывания крови VIIa, VIII, IX, а также гликопротеидных гетеродимерных гормонов – фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ).

Все эти белки в настоящий момент широко используются в клинической практике, относятся к числу жизненно необходимых лекарственных препаратов в Российской Федерации и могут производиться (в ряде случаев уже производятся) как воспроизведенные лекарственные средства. Терапевтическое значение данных белков и особенности экспрессии их генов в гетерологических системах будут подробно рассмотрены в соответствующих разделах автореферата.

Отдельной задачей для современной биохимии и биотехнологии можно считать создание искусственных гликопротеидов, заменяющих природные негликозилированные или слабо гликозилированные полипептиды в медицинской практике. Одним из возможных вариантов создания таких белков является химическая конъюгация интактных полипептидов с природным линейным полисахаридом – полисиаловой кислотой. Очевидным преимуществом таких модифицированных полипептидов (или белков) над их интактной формой является значительно большее время их полувыведения из системной циркуляции, что позволяет поддерживать их концентрацию в организме пациентов в относительно узком диапазоне при меньшем числе инъекций. Возможные варианты решения задачи получения таких конъюгатов исследованы на примерах инсулина и полипептидного гормона окситомодулина, родственного глюкагону.

Искусственные гликопротеиды и, в частности, конъюгаты полипептидов с полисиаловой кислотой, также могут рассматриваться в довольно широком контексте создания биологических лекарственных средств пролонгированного действия и полученные в настоящей работе результаты могут быть использованы для разработки конъюгатов различных белков и полипептидов с полисиаловой кислотой для последующего клинического применения.

Отдельного интереса в области создания новых лекарственных средств заслуживают фрагменты моноклональных антител, ковалентно связывающие свои небелковые антигены, в частности фосфоорганические вещества. В настоящий момент ни одно из таких веществ не допущено до клинического применения, однако уточнение механизмов их взаимодействия с антигенами (субстратами) позволит в будущем получить прототипы лекарственных средств-антидотов с надлежащей эффективностью действия.

### **Цель работы и основные задачи исследования:**

Основной целью работы была демонстрация возможности получения клональных клеточных линий, продуцирующих большие количества функциональных мономерных и гетеродимерных гликопротеидов, характеристика их основных свойств и оценка возможности их промышленного использования. Для выбранных медицински значимых полипептидов целью работы являлась разработка методов получения их инновационных полисиалированных форм, пригодных для дальнейших исследований биоактивности и безопасности *in vivo*.

Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Создать клональные клеточные линии-продуценты фактора свертывания крови VII человека (фVII) на основе линии клеток почки сирийского хомячка ВНК 21 и разработать промышленно пригодную технологию получения конечного продукта – фактора VII активированного.
2. Исследовать возможности создания клональных линий клеток-продуцентов фактора VIII на основе линии клеток яичника китайского хомячка и разработать соответствующую технологию получения и очистки целевого белка
3. Усовершенствовать существующие векторы, предназначенные для гетерологической экспрессии генов гликопротеидов в животных клетках для достижения большей продуктивности клеточных линий, секретирующих биологически активные целевые белки, на примере фактора VIII
4. Разработать подходы к созданию клеточных линий, ко-экспрессирующих целевой ген и несколько вспомогательных генов, на примере фактора IX, и создать технологию получения целевого белка, пригодного для доклинических исследований.
5. Разработать способы сбалансированной экспрессии пары генов, кодирующих субъединицы целевого гетеродимерного белка, на примерах ФСГ и ЛГ.
6. Разработать промышленно пригодную технологию получения рекомбинантного ФСГ для доклинических и клинических исследований.
7. Разработать методы получения и очистки конъюгатов полипептидов и полисиаловой кислоты, позволяющие получить искусственные гликопротеиды для исследований *in vivo*, на примерах инсулина и окситоцидина человека.
8. Установить особенности механизма взаимодействия каталитических антител с фосфоорганическими субстратами.

### **Научная новизна:**

На примере фактора VII было установлено, что промоторные области генов домашнего хозяйства млекопитающих, а именно коровый промотор гена EF1, могут быть применены для создания промышленно пригодных клеточных линий-продуцентов.

На примере фактора VIII нами было обнаружено, что эффективность использования некодирующих участков гена EEF1A1 для создания линий-продуцентов гликопротеинов может быть резко увеличена при введении в состав векторной плазмиды фрагмента конкатемера длинного концевой повтора вируса Эпштейна-Барр (EBV-TR). Данный генетический элемент увеличивал эффективность интеграции генетических конструкций в геном клетки-хозяина на полтора порядка и не препятствовал последующей амплификации в геноме клеток интегрированных кассет под действием возрастающих концентраций метотрексата.

При помощи данного подхода были получены и исследованы клональные линии-продуценты фактора VIII. Установлено, что общая продуктивность линий-продуцентов достигает 40 МЕ/мл культуры при простом периодическом культивировании, что существенно превосходит известные ранее показатели. На примере фактора IX свертывания крови продемонстрировано, что векторные плазмиды, содержащие одинаковые некодирующие участки гена EEF1A1 и элемент EBV-TR, но различные селекционные маркеры, могут быть успешно интегрированы в геном клеток при последовательных раундах трансфекции и селекции. В клональных линиях-продуцентах фактора IX была успешно проведена ко-экспрессия двух вспомогательных генов – фурина человека и витамин-К-оксиредуктазы китайского хомячка, что позволило вести биосинтез практически полностью биологического активного фактора IX с конечной продуктивностью около 6 МЕ/мл культуры, что превосходит известный мировой уровень. Полученный при помощи созданной линии клеток препарат биоаналогового фактора IX успешно прошел доклинические испытания.

На примере гетеродимерного гликопротеина фолликулостимулирующего гормона человека (ФСГ) было продемонстрировано, что разработанные векторные плазмиды позволяют вести координированную экспрессию двух различных генов при их соединении в полицистронную матрицу при помощи внутреннего сайта связывания рибосом. Путем проведения трансфекции дополнительной генетической конструкции, кодирующей только одну цепь ФСГ, были созданы клональные продуценты, секретирующие преимущественно гетеродимер ФСГ и только небольшие количества свободной альфа-цепи данного гликопротеина при конечной концентрации целевого белка около 80 мг/л культуры, что также значительно превосходит все ранее описанные системы биосинтеза ФСГ человека.

Было впервые продемонстрировано, что при удельной продуктивности клеток-продуцентов более 10 пг/клетка/день, то есть на порядок более высоким, чем в других известных случаях, уровень терминального сиалирования N-гликанов в составе ФСГ остается достаточно высоким для выделения целевого белка с полной биологической активностью *in vivo*. Получаемый при помощи созданной клональной линии-продуцента биоаналоговый ФСГ успешно прошел доклинические и клинические испытания в РФ (фаза I и фаза III).

Для пары модельных флуоресцентных белков, а также гетеродимерного белка лютеинизирующего гормона человека (ЛГ) установлено, что для векторов на основе некодирующих участков гена EEF1A1 возможна координированная амплификация в геноме клеток-продуцентов пары белков, связанных с генами различных селекционных маркеров, что позволяет более гибко управлять относительными уровнями экспрессии генов нескольких субъединиц целевых белков.

Был впервые получен конъюгат оксинтомодулина человека и полисиаловой кислоты, продемонстрировавший пролонгированный анорексигенный эффект в опытах *in vivo*. Было установлено, что для двух антител, ковалентно связывающих фосфоорганические соединения, механизм реакции может быть описан как индуцированное соответствие, рассчитаны кинетические параметры элементарных стадий процесса. Полученные результаты открывают перспективы дальнейшего совершенствования биокатализаторов на основе антител.

**Теоретическая и практическая ценность:** Результаты данной работы способствуют более глубокому пониманию процессов биосинтеза и секреции гликопротеинов различных классов гетерологичными клетками и принципов создания конъюгатов полипептидов с полисиаловой кислотой. Полученные результаты могут быть использованы для создания линий-продуцентов различных фармацевтически значимых белков, пролонгированных вариантов белков и полипептидов и нового класса ковалентных ингибиторов фосфорорганических веществ.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Установлено, что векторная плазида p1.1, включающая некодирующие последовательности ДНК из области гена фактора элонгации трансляции 1 альфа (EEF1A1) китайского хомячка и фрагмент конкатемера длинного концевое повтора вируса Эпштейна-Барр (EBV-TR) интегрируется в геном клеток CHO с существенно повышенной вероятностью и позволяет эффективно экспрессировать гены целевых белков.
2. На примере линии клеток CHO, секретирующей делеционный вариант фактора VIII свертывания крови человека показано, что уровень секреции нестабильных гликопротеинов

большого размера может быть многократно увеличен при использовании специализированного плазмидного вектора и многоступенчатой амплификации генетических кассет в геноме продуцентов.

3. На примере линии-продуцента фактора свертывания крови IX продемонстрировано, что разработанные плазмидные векторы могут быть применены для последовательных трансфекций целевого гена и вспомогательных генов.

4. Для случая фолликулостимулирующего гормона человека показано, что использование трицистронной матрицы, кодируемой плазмидой p1.1б в которой открытые рамки считывания двух субъединиц гетеродимерного целевого белка соединены при помощи внутреннего сайта связывания рибосом, позволяет получить линию-продуцент гликопротеина с исключительно высокой удельной продуктивностью и способностью секретировать преимущественно гетеродимерный целевой белок.

5. На примере лютеинизирующего гормона человека установлено, что разработанные векторные плазмиды позволяют вести ко-амплификацию пары целевых генов, один из которых связан с амплифицируемым маркером устойчивости, а второй – с неамплифицируемым маркером.

6. При помощи метода химической конъюгации полисиаловой кислоты и полипептидов получены чистые препараты гликоконъюгатов инсулина и оксинтомодулина, обладающие пролонгированной биологической активностью на животных моделях.

7. Каталитические антитела А5 и А17 образуют с фосфоорганическим веществом фосфонат X ковалентное соединение, при этом механизм реакции может быть описан как индуцированное соответствие.

**Апробация работы:** Основные научные результаты диссертационной работы были представлены на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (г. Новосибирск, 11 – 15 мая 2008 г.); Научно-практической конференции «Достижения в гематологии и трансфузиологии» (Москва, 17-18 ноября 2008 г.); III Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика» (Пушино, 10-15 октября 2010 г.); школе-конференции «Методы культивирования клеток» (Санкт-Петербург 6-10 октября 2008 г.); I Российском симпозиуме с международным участием «Биофарма-2009» (Турция, Анталия, 25-27 мая 2009 г.); Международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии» (Москва, 20-22 марта 2012 г.); 38-м Конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (FEBS) «Биологические механизмы» (Санкт-Петербург, 6-11 июля 2013 г.); V и VIII Московском международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 16-20 марта 2009 г.

и 17-20 марта 2015 г.); V Съезде физиологов СНГ и V Съезде биохимиков России (Дагомыс, 4-9 октября 2016 г.); XXVII международной конференции Российской Ассоциации Репродукции Человека «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» (Санкт-Петербург, 6—9 сентября 2017 г.); на 16-ой, 19-ой, 20-ой, 23-ей Международных Пушкинских школах-конференциях молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 16-21 апреля 2012 г., 20-24 апреля 2015 г., 18-22 апреля 2016 г., 15 – 19 апреля 2019 г.); на XXVI, XXVIII, XXIX, XXXI Зимних молодежных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 10-14 февраля 2014 г., 08-11 февраля 2016 г., 07-11 февраля 2017 г., 11-14 февраля 2019 г.).

**Публикации:** По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, из них 16 в журналах, рекомендованных ВАК РФ, материалов российских и международных конференций - 33. Оформлено 10 патентов РФ.

**Структура и объем работы:** Диссертация содержит следующие основные разделы: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, главы результатов собственных исследований и их обсуждение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 305 ссылок. Диссертация изложена на 264 страницах машинописного текста и содержит 31 таблицу и 59 рисунков.

## Результаты исследования и их обсуждение

### 1. Создание линии-продуцентов фактора VII свертывания крови человека при помощи стандартной векторной плазмиды в клетках линии ВНК

Фактор VII свертывания крови человека (фVII) в активированной форме (фVIIa) является сериновой протеазой, содержащей Gla-домен, включающий 12 остатков гамма-карбоксиглутаминовой кислоты (Gla). Фактор VII непосредственно инициирует процесс свертывания крови путем  $Ca^{2+}$ -зависимого связывания с трансмембранным белком фактор III (фIII, тканевой фактор, белковый компонент тромбопластина), экспонированным на поверхности практически всех клеток млекопитающих, кроме эндотелия сосудов. Связанные с фIII молекулы фVII на поверхности мембран клеток, вступивших в контакт с кровью из поврежденных сосудов, подвергаются протеолитической активации до фVIIa мембрано-связанными протеазами. Образующийся ферментный комплекс, называемый теназой внешнего пути, способен активировать факторы IX и X, которые, в свою очередь, собираются в состав следующих мембрано-связанных ферментных комплексов – теназы внутреннего пути и протромбиназы. Продуктом работы протромбиназы является активная сериновая протеаза тромбин, непосредственно превращающая растворимый белок фибриноген в основной компонент тромба – фибрин. При ингибиторной форме гемофилии A и в ряде других клинических ситуаций нормальная работа механизма гемостаза нарушается и теназа внутреннего пути не может синтезировать необходимое количество фХа и тромбина, вследствие чего скорость роста тромба оказывается недостаточной для остановки кровотечения. При введении в системную циркуляцию нескольких миллиграмм фVIIa рост тромба становится возможным только за счет прямой генерации фХа теназой внешнего пути и даже обширные кровотечения могут быть остановлены в течение 10-30 мин.

Поскольку молекула фVIIa человека должна содержать ряд пост-трансляционных модификаций, биологически активный фVIIa может быть получен только в культивируемых клетках млекопитающих, при этом стандартная линия клеток CHO не подходит для его биосинтеза из-за недостаточной активности фермента витамин-K-оксиредуктазы (VKORC), обеспечивающего восстановление кофактора для фермента, проводящего пост-трансляционное превращение остатков глутаминовой кислоты в Gla в составе Gla-домена фVII. Оригинальный препарат фVIIa был получен в линии клеток ВНК 21, полученных из почки сирийского хомячка (*Mesocricetus auratus*). Было предположено, что для воспроизведенного препарата фVIIa также следует использовать линию ВНК 21 и плазмидный вектор с эукариотическим промотором гена домашнего хозяйства для обеспечения высокого и постоянного уровня экспрессии целевого гена.

Область открытой рамки считывания (ОРС) кДНК фVII получили в ходе ОТ-ПЦР из мРНК культивируемых клеток человека HepG2, субклонирования в Т-вектор, верифицировали

секвенированием и перенесли в экспрессионный вектор pEFZeo, в свою очередь полученный переносом области кассеты гена устойчивости к антибиотику блеомицин (Зеоцин) из плазмиды pSV40/Zeo (Invitrogen, США) в плазмиду pEF1 (Invitrogen, США), содержащий коровью область промотора гена фактора элонгации трансляции 1 альфа (EEF1A1), первый некодирующий экзон гена EEF1A1 и первый интрон, а также область сигнала полиаденилирования и терминации транскрипции из гена гормона роста быка. Плазида pEFZeoF7 после полного секвенирования области целевого гена и линеаризации эндонуклеазой рестрикции *PvuI* использовалась для трансфекции клеток ВНК 21.

После трансфекции клетки культивировали в лунках микропланшетов как прикрепленную культуру, селекцию стабильно трансфицированных клеток вели в присутствии 0,5 мг/мл зеоцина. Методом ИФА определили лунки с максимальной концентрацией фVII в культуральной среде, которые использовали для клонирования методом предельных разведений в 96-луночных планшетах.

Среди клональных линий-продуцентов фVII человека выбрали несколько линий с максимальной общей продуктивностью, для одной из них – ВНК/F7 конечная концентрация целевого белка составила 20-40 мг/л при культивировании в присутствии 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота до момента распада монослоя клеток. Данная клеточная линия была использована для получения фVII в бессывороточной среде в условиях роллерного культивирования. Очистку продукта проводили при помощи последовательных стадий ультрафильтрации/диафильтрации, ионообменной хроматографии, аффинной хроматографии, активации до фVIIa в процессе второй ионообменной хроматографии и финишной ультрафильтрации/диафильтрации. Обнаружено, что в условиях роллерного культивирования с периодической сменой бессывороточной среды клеточная линия ВНК/F7 развивала значительно меньшую продуктивность и выход конечного продукта не превышал 3 мг с одного литра среды, что приблизительно соответствовало продуктивности клеточной линии, использованной в получении оригинального лекарственного средства фVIIa НовоСэвен. Такая относительно невысокая продуктивность была вызвана невозможностью адаптации клеточной линии ВНК 21 и ее производных к постоянному культивированию в бессывороточной среде и необходимостью вести наработку продукта в течение небольшого времени в добавляемых к адгезионной культуре порциях бессывороточной среды. Биологическая активность фVIIa исследована на животной модели состояния острого кровотечения, при этом была продемонстрирована биоэквивалентность оригинального препарата фVIIa НовоСэвен и продукта клеточной линии ВНК/F7.

## **2. Создание линии продуцента фактора VIII с делецией В-домена на базе стандартной экспрессионной системы в клетках линии СНО**

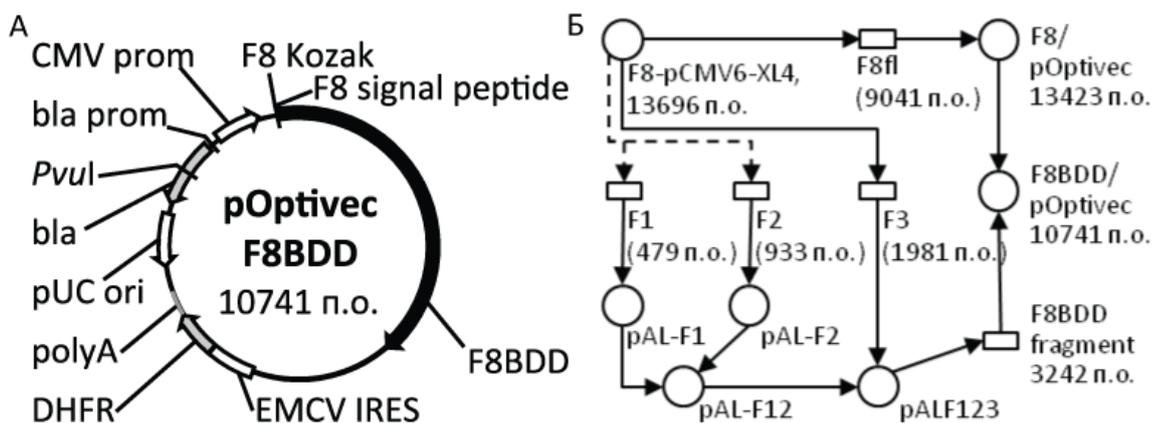
Фактор свертывания крови VIII (фVIII) - это неэнзиматический кофактор фактора IXa, который при протеолитической активации образует с фактором IXa плотный нековалентный комплекс,

связывающий и активирующий фактор X (фX). Дефекты гена фVIII могут приводить к развитию гемофилии А – X-связанного рецессивного генетического заболевания с частотой встречаемости около 1 случая на 5 тысяч мужчин. Единственной эффективной терапией гемофилии А является регулярно проводимая заместительная терапия лекарственными препаратами фVIII. Традиционный источник фVIII – это донорская плазма крови, количество которой ограничено. Ее использование в качестве сырья для получения терапевтических белков связано с риском передачи пациентам вирусных и прионных инфекций. Рекомбинантный фVIII человека (рчфVIII) для терапии гемофилии А может быть получен в культивируемых клетках млекопитающих. Допущенные к медицинскому применению варианты рчфVIII обычно секретируются клетками CHO и полностью эквивалентны фVIII из донорской плазмы при проведении заместительной терапии.

Основным недостатком существующих методов получения рчфVIII является крайне низкий уровень экспрессии, вызванный большим размером целевого белка и сложным набором посттрансляционных модификаций. При удалении домена В, составляющего значительную часть молекулы фVIII, удельная прокоагуляционная активность фVIII и его период полураспада в плазме крови практически не падают. Замена домена В на короткий линкерный пептид, обозначаемый как SQ, приводит к существенному увеличению уровня продукции фVIII в клетках CHO и почти полному протеолитическому процессингу белка-предшественника до зрелой двухцепочечной формы. Медицинский препарат рчфVIII с делецией домена В (фVIII BDD SQ) допущен к медицинскому применению, его показатели эффективности и безопасности аналогичны таковым для препаратов полноразмерного рчфVIII. Типичные опубликованные уровни продуктивности для клеток линии CHO, продуцирующих фVIII BDD SQ, составляли 0,5-2 МЕ/мл, что соответствует концентрации фVIII около 0,2 мкг/мл и на несколько порядков уступает продуктивности промышленных продуцентов других рекомбинантных факторов свертывания крови (VII, IX).

## 2.1. Создание экспрессионных конструкций делеционного мутанта фVIII

Для экспрессии полноразмерного фVIII на основе вектора pOptivec-ТОРО (Invitrogen, США) была создана конструкция pOptivec/F8, для варианта фVIII BDD SQ - pOptivec/F8BDD (Рис. 1).



### Рисунок 1. Карта экспрессионной плазмиды рOptivec/F8BDD и общая схема клонирования

CMV-prom – промотор цитомегаловируса, F8 Kozak – природная последовательность Козак гена *φVIII*, F8 signal peptide – последовательность, кодирующая природный сигнальный пептид *φVIII*, F8BDD – ОРС *φVIII* BDD SQ, EMCV IRES – внутренний участок связывания рибосом EMCV, DHFR – ОРС дигидрофолатредуктазы, polyA – сигнал полиаденилирования гормона роста быка, рUC ori – бактериальная область начала репликации, bla – ОРС β-лактамазы, bla prom – промотор гена β-лактамазы. Направление транскрипции генов указано стрелками. Б. Прямоугольники - линейные фрагменты ДНК, круги – плазмиды. Пунктир – ПЦР, сплошная линия - рестрикция-лигирование.

### 2.2 Получение и характеристика линии-производителя BDD-*φVIII*

Клетки CHO DG-44, дефектные по *dhfr*, трансфицировали линейаризованными плазмидами в бессывороточной среде. Для рOptivec/F8 все три популяции секретируют менее 10 МЕ/л *φVIII* по данным ИФА, а для делеционного варианта обнаружили популяцию, секретирующую  $71 \pm 10$  МЕ/л целевого белка. Эту популяцию использовали для амплификации трансгена под действием MTX, начиная с концентрации 25 нм (Рис. 2). В течение всего курса амплификации плавного подъема уровня секреции BDD-*φVIII* не наблюдалось, максимальный уровень BDD-*φVIII* зафиксирован после пяти шагов амплификации (при 0,5 мкМ MTX), а дальнейшее увеличение концентрации MTX привело к падению уровня секреции в 10 раз с последующим возвращением к величинам, примерно соответствующим исходной культуре стабильно трансфицированных клеток ( $74 \pm 6$  МЕ/л для 16 мкМ MTX). Это явление можно объяснить увеличением в популяции доли непродуцирующих клеток, содержащих измененную бицистронную мРНК или амплифицированные «посторонние» гены, например, ген множественной лекарственной устойчивости, кодирующий гликопротеин Р. Популяцию клеток, полученную в присутствии 0,5 мкМ MTX, использовали для клонирования клеток методом предельного разведения (табл. 1).

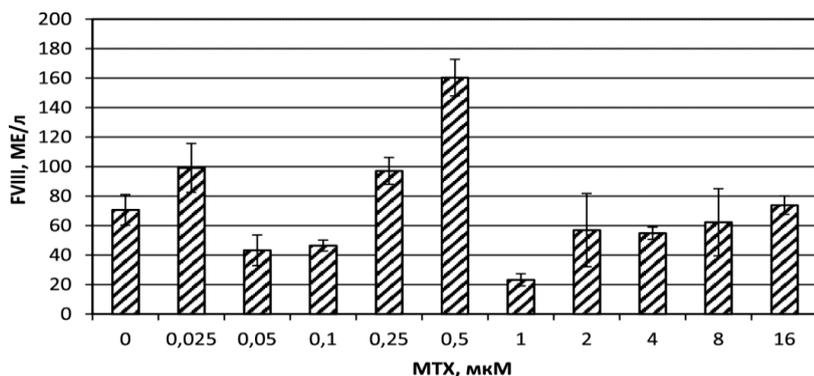


Рисунок 2. Уровень секреции BDD-*φVIII* в конглоуэнтных клеточных популяциях по данным ИФА. Измерения проводили в двух повторностях, погрешности указаны для доверительных интервалов 95%.

Таблица 1. Секреция BDD-*φVIII* 10 наиболее продуктивными клональными клеточными линиями

Клональная линия, номер	18	22	17	9	1	2	15	3	4	16
Секретируемый BDD- <i>φVIII</i> , МЕ/л*	502	475	434	416	410	399	395	379	378	375

\*Концентрацию секретируемого продукта измеряли для прикрепленных культур в момент достижения конглоуэнтности.

При продолжительном культивировании клональных линий #18 и #22 не зафиксировано существенного падения уровня BDD-*φVIII*. Более продуктивную линию #18 выбрали для

дальнейшего использования и назвали DG-BDDFVIII-18. Секретируемый BDD-фVIII из кондиционированной среды и клеточных лизатов DG-BDDFVIII-18 по данным иммуноблоттинга находился практически полностью в двухцепочечной форме (Рис. 6).

Основная часть секретируемого BDD-фVIII и его внутриклеточного белка-предшественника была процессирована до двухцепочечной формы. Подвижность полос тяжелой и легкой цепей при ДСН-ПААГ соответствовала опубликованной подвижности цепей BDD-фVIII. Прокоагуляционная активность BDD-фVIII в кондиционированной среде составила 0,47 МЕ/мл, а концентрация антигена фVIII по ИФА - 0,52 МЕ/мл. Секретируемый продукт обладал полной удельной прокоагуляционной активностью.

### **3. Дизайн генетических элементов для оригинальной системы экспрессии p.1.1**

В качестве элемента, обеспечивающего транскрипционную активность целевого гена, выбран конститутивный аутологичный промотор СНО, и области, фланкирующие ген *EEF1A1* клеток СНО. Ограничением векторов, включающих ОРС и протяженные регуляторные области, может являться низкая эффективность трансфекции и низкая частота амплификации целевого гена в геноме, вызванная большим размером генетической кассеты и возможностью независимой амплификации гена селекционного маркера. Для уменьшения размера генетической кассеты была создана плаزمиды минимального размера (бэжбон), на основе которой собирался экспрессионный вектор. Для увеличения вероятности интеграции и частоты амплификации в вектор ввели фрагмент вируса Эпштейна-Барр EBV-TR.

#### **3.1. Получение минимального базового вектора pBL-2 и фланкирующих областей гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка**

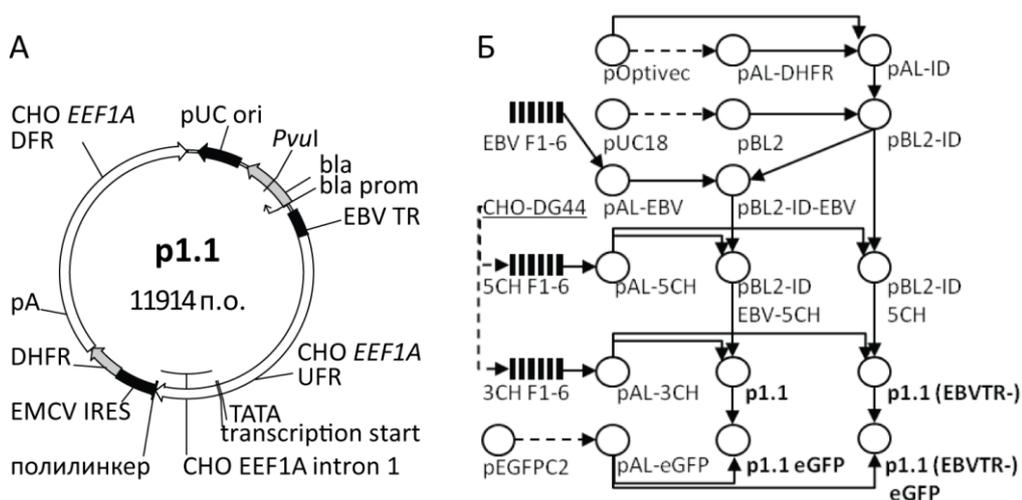
Методом инвертированной ПЦР был получен минимальный базовый вектор pBL-2 для сборки экспрессионной плазмиды. Он обладал минимальным размером, высокой копийностью в бактериях и был пригоден для клонирования сложных последовательностей. Первичная последовательность гена фактора элонгации трансляции 1 альфа китайского хомячка (*EEF1A1*) и фланкирующих его областей ДНК была определена в работе Бегущего Оленя и Аллисона, последовательности были депонированы в публичную базу данных GenBank под номером AY188393. В данной работе также было показано, что два участка ДНК из AY188393, соответствующие позициям 8532–12603 и 14545–18794, содержат все необходимые элементы для стабильной экспрессии гетерологичных белков в клетках млекопитающих.

Для получения данных фрагментов ДНК применялась стратегия модульной сборки. Фланкирующие районы гена *EEF1A1* были поделены на 5 и 6 модулей. Небольшая длина модулей (<0,8 т.п.о.) позволяла проводить их полное секвенирование с одной пары праймеров, то есть быстро и экономично получить полностью корректную последовательность целевых геномных

участков. При решении этой задачи была разработана программа BIOF для разбиения геномных последовательностей на модули, содержащие гибридные рестриктивные сайты. Данная стратегия клонирования может применяться для других приложений, например, для получения ОРС редких транскриптов в ходе *in vitro* сплайсинга. Все 11 модулей были получены методом ПЦР с геномной ДНК из клеток CHO DG44 без оптимизации условий, клонированы в Т-вектор, и собраны последовательными шагами рестрикции-лигирования.

### 3.2. Получение экспрессионного вектора p1.1

Экспрессионный вектор p1.1 (Рис. 3) собран на основе разработанного нами нетранскрибируемого вектора pBL-2, в который последовательно добавляли собранные из модулей геномные области, фланкирующие ген *EEF1A1* CHO, фрагмент конкатемера терминальных повторов EBV, EMCV IRES и ОРС DHFR мыши. Был также создан контрольный вектор p1.1 (EBVTR-) без повторов EBV. Для проверки их функциональных свойств векторов в них использовали конструкции p1.1-eGFP и p1.1(EBVTR-)-eGFP с ОРС зеленого флуоресцентного белка eGFP.



**Рисунок 3. Карта экспрессионного вектора p1.1 и общая схема клонирования.**

А. CHO *EEF1A1* UFR и DFR - районы, фланкирующие ген *EEF1A1* CHO, pA - сигнал полиаденилирования гена *EEF1A1* CHO; TATA, transcription start – TATA-бокс и точка начала транскрипции; CHO *EEF1A1* intron 1 – первый интрон гена *EEF1A1* CHO, pUC ori – область начала репликации; bla – ОРС β-лактамазы, bla prom – промотор гена β-лактамазы; EBVTR - участок терминального повтора EBV; EMCV IRES – внутренний сайт связывания рибосом EMCV; DHFR – ОРС дигидрофолатредуктазы мыши для отбора и амплификации в эукариотических клетках; Стрелками указаны направления транскрипции генов. Б. Прямоугольники – ПЦР-продукты, круги – плазмиды. Пунктир – ПЦР, сплошная линия - рестрикция-лигирование.

### 3.3. Проверка свойств вектора p1.1 и определение условий получения стабильно трансфицированных линий клеток и амплификации трансгена для модельного белка eGFP

Клетки CHO DG-44 трансфицировали сверхскрученными плазмидами и через 48 часов определяли интенсивность флуоресценции eGFP в лизате клеток и долю флуоресцирующих клеток.

Доля транзигентно трансфицированных клеток и общий уровень продукции eGFP не различались для случаев трансфекции клеток CHO DG-44 плазмидами, содержащими или не содержащими участок EBVTR. Эффективность транзигентной трансфекции для плазмид на основе вектора p1.1 была значительно ниже, чем для контрольной плазмиды pEGFP-N2 с минимальным вирусным промотором, что объясняется большей длиной вектора p1.1.

Линеаризованные плазмиды p1.1-EGFP и p1.1(EBVTR-)-EGFP использовали для трансфекции клеток и последующей селекции стабильно трансфицированных поликлональных популяций. Было зафиксировано существенное увеличение минимальной концентрации клеток, возникающее в процессе первичной селекции - 147,5 тыс. клеток/мл при доле жизнеспособных клеток 27,7% для плазмиды p1.1-EGFP и только 42,5 тыс. клеток/мл при доле жизнеспособных 3,6% для контрольной плазмиды p1.1(EBVTR-)-EGFP. Средний уровень экспрессии eGFP для обеих полученных популяций не имел существенных различий – 62,0 тыс. ОЕФ/50 тыс. клеток и 63,8 тыс. ОЕФ/50 тыс. клеток, соответственно. Участок EBVTR не влиял на средний уровень экспрессии трансгена для стабильно трансфицированных линий клеток.

Для количественной оценки уровня интеграции плазмид в геном продуцентов через 48 ч после трансфекции клетки перемещали в селекционную среду и высевали в лунки микропланшетов по 5 тыс. клеток на лунку. Через 2 недели после посева подсчитывали общее число выросших колоний, число флуоресцирующих колоний и уровень флуоресценции для нескольких колоний с максимальной интенсивностью флуоресценции (табл. 2). При высевании в лунки планшетов клеток, обработанных трансфекционным реагентом без добавления плазмид, колониеобразование не происходило.

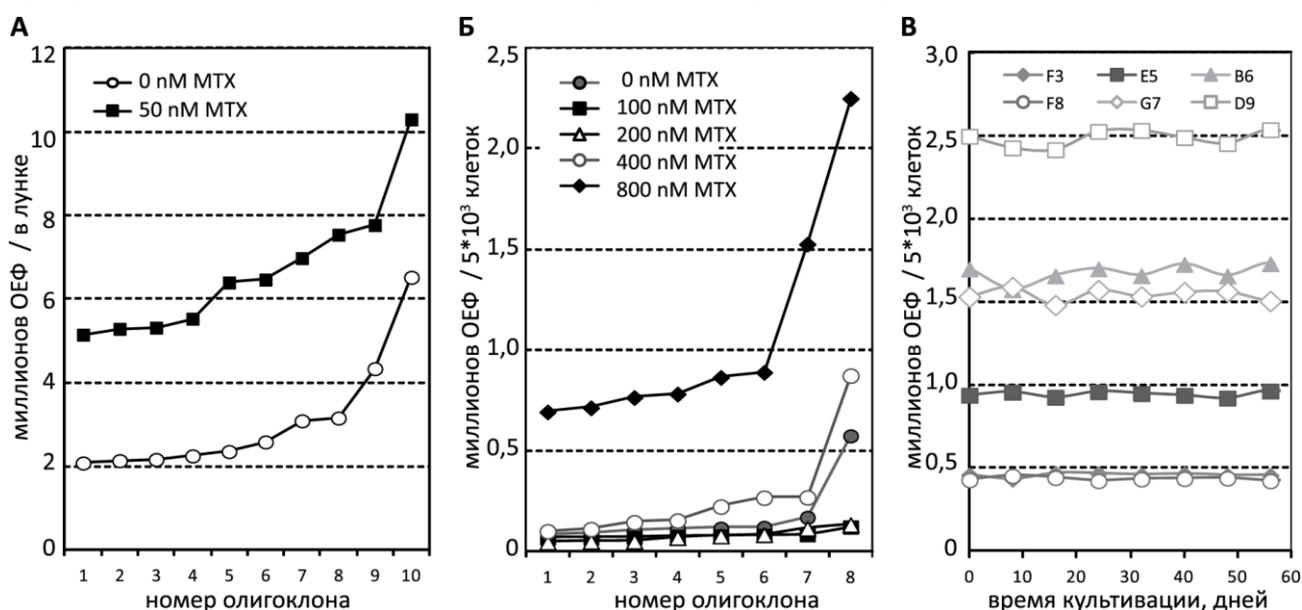
**Таблица 2. Эффективность колониеобразования при стабильной трансфекции клеток CHO плазмидами с участком EBVTR и без него**

Название плазмиды	pEGFP-N2	p1.1-EGFP	p1.1(EBVTR-)-EGFP
Транзигентно трансфицированные клетки, %	22,8%	5,8%	6,0%
Удельная интенсивность флуоресценции, тыс. ОЕФ/50 тыс. клт	114	35,3	31,9
Жизнеспособные клетки, %	86%	83%	84%

При получении олигоклональных линий-продуцентов eGFP трансфекция плазмидой с EBVTR, позволила увеличить количество позитивных колоний в 40 раз, при этом уровень экспрессии eGFP для самой продуктивной олигоклональной линии был выше в 4,6 раза. При добавлении к культуральной среде при первичной селекции ингибитора DHFR метотрексата (MTX) уровень флуоресценции для 10 лунок с максимальным сигналом был приблизительно вдвое выше, чем для 10 лунок с максимальным сигналом, полученных селекцией без введения MTX. (Рис. 4А). Для дальнейшего увеличения продуктивности клеток в полученных олигоклональных популяциях проводили амплификацию под действием больших концентраций MTX. Клетки из наиболее

продуктивных олигоклональных популяций высевали в лунки микропланшетов в присутствии различных концентраций МТХ. Для плазмиды p1.1(EBVTR-)-EGFP не наблюдали значимого увеличения уровня флуоресценции при концентрациях МТХ до 200 нм и не наблюдали образования колоний при концентрациях МТХ 400 и 800 нм. В случае плазмиды p1.1-EGFP были получены колонии для всех концентраций МТХ. Удельная интенсивность флуоресценции лизатов клеток для 8 колоний с максимальным уровнем экспрессии eGFP (для каждого уровня МТХ), приведенная на Рис. 4Б, демонстрирует многократный рост продуктивности клеток.

Таким образом, наличие участка EBVTR в плазмиде p1.1 существенно увеличивает скорость амплификации целевого гена и позволяет получать высокопродуктивные линии в короткие сроки (15 дней) под действием относительно высоких концентраций МТХ. Возможный механизм действия участка EBVTR при амплификации целевого гена – образование шпильки на одноцепочечной ДНК при транспозиции области целевого гена, ускорение амплификации трансгенов.



**Рисунок 4.** Удельная интенсивность флуоресценции для наиболее продуктивных олигоклональных линий, экспрессирующих eGFP.

А Уровень экспрессии eGFP для 10 наиболее продуктивных олигоклональных лунок, при культивации в среде, содержащей 0 и 50 нМ МТХ; Б. Уровень экспрессии eGFP для 8 наиболее продуктивных олигоклонов, полученных при амплификации трансгена под действием различных концентраций МТХ; исходная олигоклональная популяция получена без МТХ. Для всех серий панели Б – 1 шаг амплификации трансгена под действием МТХ, для каждого уровня МТХ анализировали по 2х96 лунок. В. Постоянство экспрессии eGFP линиями-продуцентами при суспензионном культивировании (пассирование 1 раз в 4 дня). ОЕФ – относительные единицы флуоресценции.

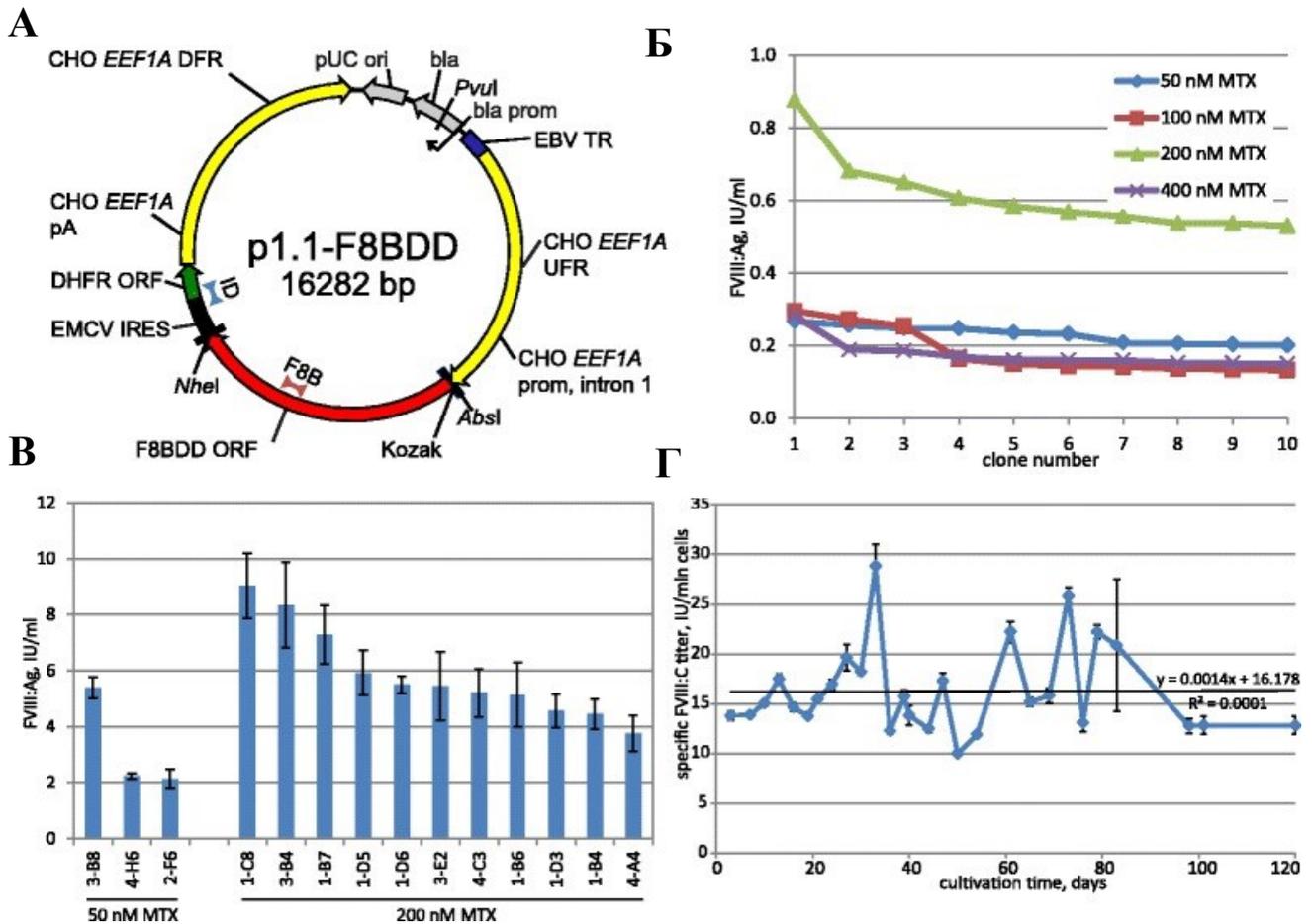
Продуктивность нескольких наилучших олигоклональных линий может быть увеличена приблизительно в 5 раз при выполнении однократной процедуры амплификации. Для нескольких олигоклональных популяций, полученных путем геномной амплификации, получили моноклональные линии-продуценты eGFP; для 6 линий с различными уровнями продуктивности при продолжительном культивировании значимого изменения уровня продуктивности не наблюдалось

(Рис. 4В). Линии-продуценты, полученные при трансфекции клеток CHO DG-44 плазмидой на основе вектора p1.1 и последующей одностадийной амплификации целевого гена, сохраняли стабильный уровень экспрессии целевого гена в течение 60 дней. Такой срок обычно считается достаточным для промышленного использования линий-продуцентов в биофармацевтике.

#### **4. Получение и характеристика линий-продуцентов BDD-фVIII на основе разработанной системы экспрессии**

Генетическая конструкция p1.1-F8BDD (Рис. 5А) была получена лигированием ОРС фVIII BDD SQ и консенсусной последовательности Козак с вектором p1.1, оба нетранслируемых участка кДНК фVIII были полностью удалены, т.е. ОРС фVIII была полностью перемещена в контекст гена *EEF1A1*. Трансфекцию и получение первичной популяции клеток-продуцентов проводили в тех же условиях, что и для плазмиды pOptivec/F8BDD. Уровень секреции фVIII для транзитивно трансфицированной культуры составлял только 9 мМЕ/мл, но для стабильно трансфицированной популяции он возрастал до 134 мМЕ/мл по данным ИФА. Полученную поликлональную популяцию использовали для проведения амплификации целевого гена в адгезионной культуре при концентрациях МТХ 50, 100, 200, 400 нМ (Рис. 5 Б); одновременно с этим повторно провели трансфекцию клеток CHO DG-44 плазмидой p1.1-фVIII-BDD и провели первичную селекцию продуцентов в присутствии 50 нМ МТХ в условиях адгезионной культуры. Наиболее продуктивные олигоклональные линии реадаптировали к культивации в суспензионных условиях (Рис. 5 В). Для дальнейшей амплификации трансгена была выбрана олигоклональная линия 3-В8, полученная первичной селекцией при концентрации МТХ 50 нМ и секретирующая только интактный фVIII по данным иммуноблоттинга (Рис. 6).

При постепенном повышении концентрации МТХ в суспензионной культуре линии 3-В8 обнаружено, что существенное падение жизнеспособности клеток наблюдается при концентрации МТХ 1 мкМ. Наиболее продуктивная поликлональная популяция клеток получена при культивации в присутствии 4 мкМ МТХ (табл. 3) и использована для генерации клональных линий-продуцентов методом конечных разведений. Была получена 361 изолированная колония, среди которых выбрана наиболее продуктивная моноклональная линия-продуцент 11А4Н, обладающая удельной продуктивностью 7,7 мкМЕ/клт/д по данным коагулометрии и временем деления 30 ч.



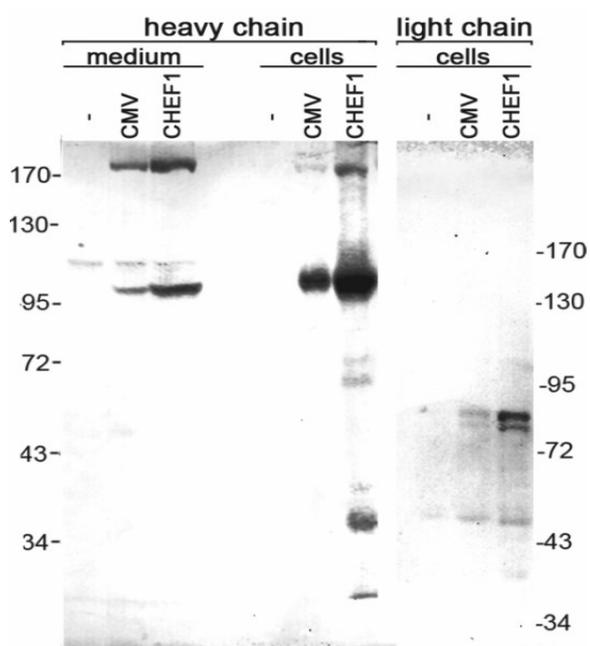
**Рисунок 5. Схема экспрессионной конструкции, уровень секреции фVIII при амплификации трансгена при помощи МТХ или первичной селекции в адгезионной культуре, динамика продуктивности клональной линии-продуцента при периодическом культивировании.**

**А** – схема экспрессионной конструкции p1.1-F8BDD. Обозначения: CHO *EEF1A1* UFR – апстрим область, фланкирующая ген *EEF1A1*, DFR – даунстрим область, фланкирующая ген *EEF1A1*, prom, intron 1 – промотор (точка инициации синтеза РНК) гена *EEF1A1* и его первый интрон. Kozak – последовательность Козак, F8BDD ORF – область ОРС фVIII, pA – сайт полиаденилирования гена *EEF1A1*, ID и F8B – участки, соответствующие ампликонам ОТ-ПЦР. Серым обозначена балластная ДНК. Остальные обозначения аналогично схеме плазмиды p1.1.

**Б** – уровень секреции для лучших 10 олигоклональных линий, отобранных среди 182 лунок для каждой использованной концентрации МТХ, измерение в момент достижения конfluence в первых 10% лунок.

**В** – уровень секреции фVIII для олигоклональных линий после реадaptации к суспензионному культивированию. Концентрация фVIII измерена ИФА для культуральной среды, взятой по достижении клетками концентрации 1,2 млн клт/мл.

**Г** – удельная продуктивность клеток линии 11A4Н при периодическом культивировании, 3-4 дня между пассажами. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям, n=2. Линии 2-F6, 3-B8, 4-H6 получены первичной селекцией в адгезионной культуре, остальные линии получены при концентрации МТХ 200 нМ.



**Рисунок 6. Иммуноблоттинг секретированного и внутриклеточного BDD-фVIII для различных продуцентов «heavy chain» и «light chain» – гибридизация с моноклональными антителами к тяжелой и легкой цепи фVIII соответственно; «CMV» и «CHEF1» – образцы, соответствующие клеткам линии DG-BDDфVIII-18 (промотор CMV) и 3-B8 (промотор CHEF1), соответственно. Приведенные для каждого из антител дорожки соответствуют одной мембране, разделение в 7.5% ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях, молекулярные массы указаны в кДа.**

При культивировании линии 11A4H в перемешиваемой колбе в течение пяти суток в стандартной безбелковой культуральной среде ProCHO 4 достигнут уровень фVIII:С  $39 \pm 3$  МЕ/мл при конечной концентрации клеток 3,5 млн/мл и жизнеспособности более 85%. Для выбранной линии 11A4H постоянство уровня секреции фVIII подтверждено для 60 дней последовательного культивирования в отсутствие МТХ (Рис. 5 Г).

**Таблица 3. Схема получения и продуктивность основных линий и популяций продуцентов фVIII**

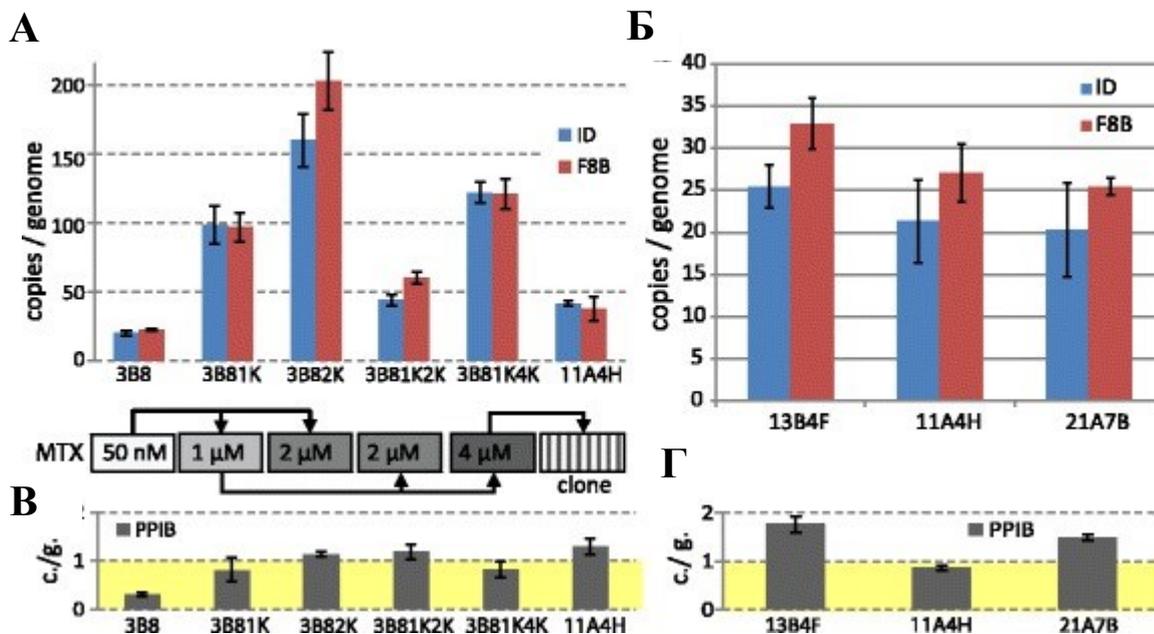
Название линии/ популяции/ клеток	Схема селекции и амплификации при помощи метотрексата	Уровень секреции FVIII, МЕ/мл	Удельная продуктивность, мкМЕ/клт/д
3-B8	50 нМ	$5,4 \pm 0,4^*$	-
3-B8 1K	50 нМ → 500 нМ → 1 мкМ	20,1*	-
3-B8 2K	50 нМ → 500 нМ → 2 мкМ	18,8*	-
3-B8 1K 2K	50 нМ → 500 нМ → 1 мкМ → 2 мкМ	17,6**	-
3-B8 1K 4K	50 нМ → 500 нМ → 1 мкМ → 4 мкМ	18,6**	-
13B4F	50 нМ → 500 нМ → 1 мкМ → 4 мкМ → клонирование	$39,0 \pm 5,5^{***}$	6,5
11A4H	50 нМ → 500 нМ → 1 мкМ → 4 мкМ → клонирование	$39,4 \pm 3,4^{***}$	7,7
21A7B	50 нМ → 500 нМ → 1 мкМ → 4 мкМ → клонирование	$34,4 \pm 0,8^{***}$	6,2

\* - измерение концентрации фVIII по ИФА, стандарт – полноразмерный рчфVIII.

\*\* - измерение активности фVIII одностадийным коагулометрическим методом.

\*\*\* - измерение активности фVIII двухстадийным коагулометрическим методом.

Методом ПЦР-РВ подтверждена амплификация экспрессионной кассеты в геноме CHO (Рис. 7).



**Рисунок 7. Копийность экспрессионной кассеты в геноме по данным ПЦР-РВ.**

А. Изменение средней копииности экспрессионной кассеты в ходе амплификации. ID- данные, полученные при помощи праймеров к области IRES-DHFR, F8B - к области OPC SQ FVIII BDD. Приведена схема амплификации, где указаны использованные концентрации MTX.

Б. Данные для праймеров к области гена пептидил-пролил изомеразы В (PPIB), предположительно уникальной для генома CHO. В. Копийность кассеты для трех клонов-продуценты фVIII - 13B4F, 11A4H, 21A7B. SPCD - удельная продуктивность клонов, мкгМЕ/клет./день. Приведено число копий на гаплоидный геном CHO.

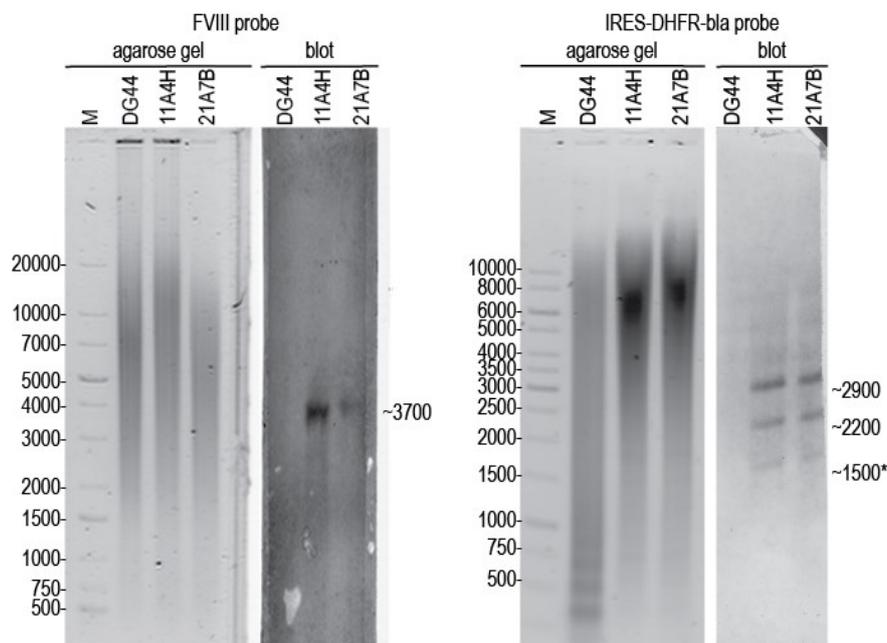
В, Г. Найденная копииность гена PPIB в образцах геномной ДНК, соответствующей панелям А, Б. Данные представлены в виде «среднее значение ± стандартное отклонение от среднего».

Сравнение данных, полученных с использованием праймеров к области IRES и гена дигидрофолатредуктазы мыши и праймеров к OPC фVIII-BDD (области SQ делеции В-домена) показало сохранение сцепления гена селекционного маркера и целевого гена, то есть интактности экспрессионной кассеты при амплификации. Линия-продуцент 11A4H содержит  $29 \pm 1$  копий трансгена на гаплоидный геном.

При анализе кДНК методом ПЦР-РВ не выявлено значимых отличий в уровне транскрипции трансгена между тремя клонами с максимальной продуктивностью, одновременно с этим уровень секреции продукта был максимален для клона с повышенным уровнем экспрессии шаперона BiP. Методом гибридизации по Саузерну для клонов 11A4H и 21A7B установлено, что копии интегрированного в геном клеток-продуцентов экспрессионного вектора в основном присутствуют в неизменном виде (Рис. 8).

Для области OPC фVIII не обнаруживаются рестриктных фрагментов измененной длины, а для областей DHFR, EMCV IRES, bla наблюдается присутствие одного укороченного рестриктоного фрагмента, что может указывать на наличие преобладающего разрыва последовательности ДНК экспрессионной конструкции в одной из этих областей, то есть предположительного нахождения

преобладающей точки рекомбинации ДНК экспрессионной конструкции и геномной ДНК клетки-хозяина в одной из них.

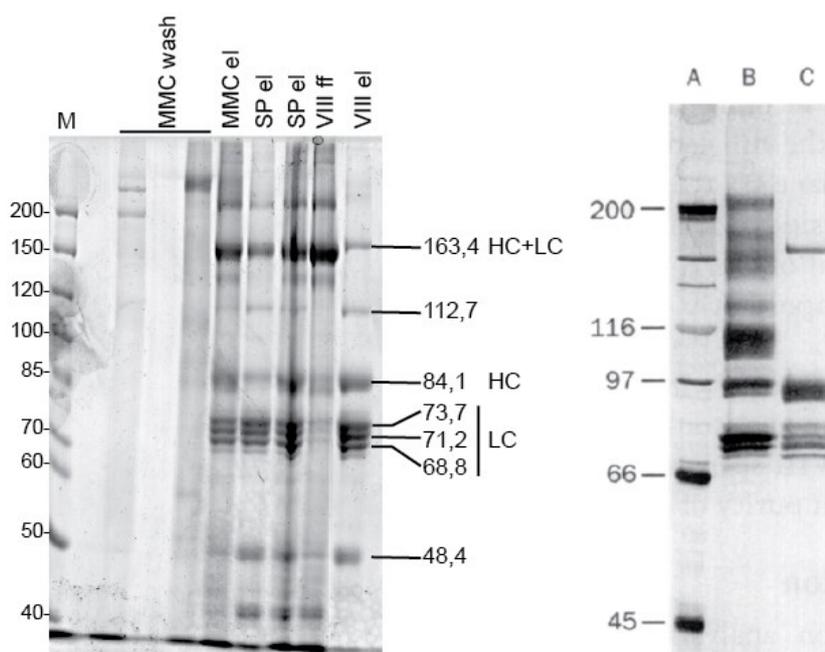


**Рисунок 8. Анализ геномной ДНК клонов – продуцентов фVIII методом гибридизации по Саузерну с мечеными биотином зондами.**

фVIII probe - гибридизация с зондом к области OPC фVIII, IRES-DHFR-bla – с зондом к вспомогательным областям экспрессионной кассеты (OPC DHFR, EMCV IRES, bla, pUC18 ori). Геномная ДНК рестрицирована *EcoRI*. Изображения ДНК в геле инвертированы, контраст сканограмм окрашенных мембран увеличен для улучшения видимости полос гибридизации.

#### 4.1. Очистка и характеристика BDD-фVIII

Выделение и очистку фVIII из культуральной среды проводили при помощи пяти последовательных стадий хроматографии, ультрафильтрацию и сходные методы разделения не использовали из-за необратимого связывания фVIII с материалом ультрафильтрационных мембран. Данные гель-электрофореза белковых фракций, полученных на трех первых стадиях очистки, приведены на Рис. 9, таблица очистки приведена в Таб. 4. Установлено, что гомогенный по данным электрофореза препарат фVIII может быть получен при помощи стадий очистки на сорбентах Capto MMC, SP Sepharose, VIII Select, однако удельная прокоагуляционная активность, соответствующая фармакопейным требованиям для лекарственного препарата делеционного варианта фVIII «ReFacto», достигается только после проведения пяти стадий очистки. Общий выход целевого белка (по прокоагуляционной активности) составил более 20%, что позволяет считать использованный процесс выделения и очистки пригодным для промышленного использования.



**Рисунок 9. Электрофореграмма белковых фракций препарата фVIII в процессе хроматографической очистки.**  
 Обозначения: М – маркер; MMC wash – фракции промывки, стадия 1; SP el – фракции элюции, стадия 2; VIII ff – фракция проскока, стадия 3; VIII el – фракция элюции, стадия 3. HC – тяжелая цепь, LC – легкая цепь. Молекулярные массы указаны в кДа. Восстанавливающие условия, окраска коллоидным Кумасси синим. Контрольные дорожки А, В, С приведены из Sandberg H. et al // *Semin Hematol*, V.38, N.2, (2001), 41-42.

**Таблица 4. Таблица очистки фVIII**

№ стадии	Тип хроматографии	Сорбент	Объем, мл	Белок, мг/мл*	Активность, МЕ/мл**	Удельная активность, МЕ/мг	Кол-во фVIII, тыс. МЕ	Выход стадии	Выход общий
0	Культуральная среда	-	320	-	36,3	-	11,6	-	-
1	Мультимодальная катионообменная	Capto MMC	17	0,233	496,9	2133	8,45	73%	73%
2	Катионообменная	SP Sepharose	10	0,271	538,1	1986	5,38	64%	46%
3	Аффинная	VIII Select	11	0,046	382,0	8304	4,2	78%	36%
4+5	Анионообменная + гель-фильтрация	Capto Q+ Superdex 75	10	0,026	284,1	10925	2,84	68%	24%

Примечания: \*- на стадиях 0-3 измерение по методу Брэдфорд, на стадии 4+5 УФ-спектрометрией;  
 \*\*- измерение прокоагулянтной активности методом АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время).

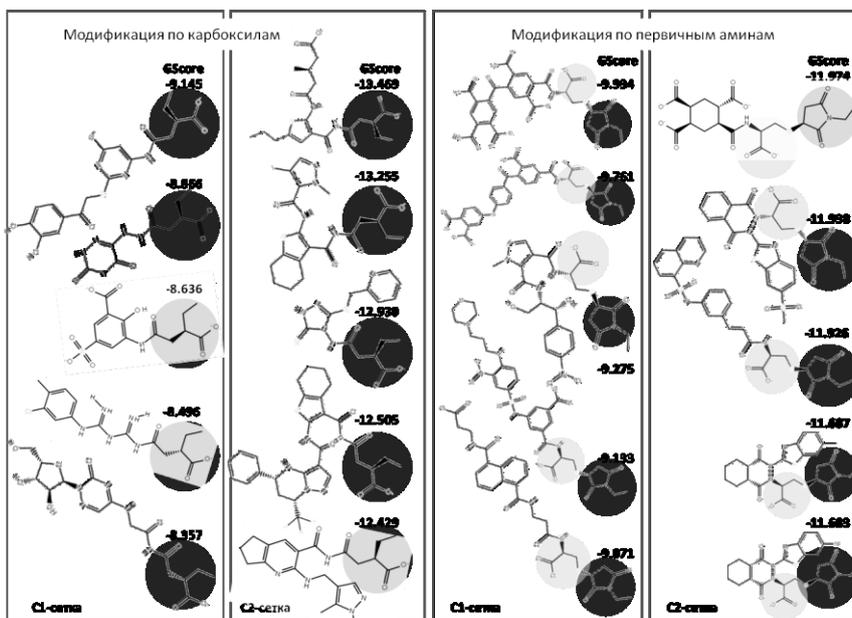
Идентификацию триптических пептидов очищенного BDD-фVIII проводили методом масс-спектрометрии. В масс-спектрах триптических гидролизатов цепей BDD-фVIII и одноцепочечной формы белка были обнаружены пики, суммарно соответствующие пептидам, составляющим 44% общей длины BDD-фVIII. В стандартном режиме работы масс-спектрометра (positive mode) не выявлен пик пептида, потенциально содержащего три остатка сульфотиروزина, а также не выявлены пики пептидов, содержащих три полностью занятых сайта N-гликозилирования, но были найдены пики пептидов, с частично занятыми сайтами O-гликозилирования T1651, T1652, пики пептидов, потенциально содержащих одиночные остатки сульфотиозинов и пик интактного пептида 37-47, содержащего частично заполненный сайт N-гликозилирования N41. Присутствие в спектрах пиков пептидов с немодифицированными остатками тирозина может быть объяснено как их неполным сульфатированием, так и фрагментацией пептидов при ионизации.

## 4.2 Компьютерное моделирование, поиск синтетического лиганда для очистки

При получении фармацевтических препаратов фVIII с помощью иммуноаффинных сорбентов у пациентов выявлялись аллергические реакции на остаточный иммуноглобулин мыши. Альтернативой иммунсорбентам являются сорбенты с иммобилизованными малыми молекулами. Компьютерное моделирование таких лигандов проведено в две последовательные стадии: докинга виртуальной библиотеки химических соединений Asinex против пространственных рецепторных решёток доменов C1 и C2 фVIII, и докинга виртуальной библиотеки ChemBridge против тех же пространственных рецепторных решёток. Для проверки релевантности выбранных сайтов связывания использовались известные лиганды фVIII - L3 и L4, для которых была экспериментально продемонстрирована возможность адсорбции фVIII и его элюции 50% раствором этиленгликоля. Для поиска сайтов связывания были выбраны поверхности доменов C1 и C2 фVIII, содержащие большое количество как ионизированных, так и гидрофобных боковых цепей аминокислот (согласно анализу распределения заряда и гидрофобных областей по поверхности фVIII при помощи утилиты SiteMap), и образующие область контакта фVIII с мембраной.

Над поверхностями потенциальных сайтов связывания располагались границы рецепторных решёток кубической формы со стороной 34 ангстрема. Докинг известных лигандов L3 и L4 в рецепторные решётки предполагаемых сайтов связывания доменов C1 и C2 дал величины композитного индекса Glidescore в диапазоне -7 – -9. Докинг библиотек химических соединений производился по схеме последовательного обогащения более энергетически выгодными лигандами, связывающимися с рецепторными сайтами. Докинг библиотеки Asinex позволил отобрать 40 наиболее энергетически выгодных молекул-кандидатов, величина Glidescore для которых соответствовала диапазону Glidescore конформеров L3 и L4. Значительная часть (24) соединений с наилучшими (наиболее отрицательными) значениями Glidescore имели в составе карбоксильную группу (16 из 24 содержали 2 и более карбоксильных групп).

Для проведения докинга виртуальной библиотеки химических соединений ChemBridge большого размера из нее предварительно была отделена суб-библиотека размером в 120 тыс. соединений, имеющих первичные амино- или карбокси- группы, то есть пригодных для иммобилизации на подложке. Строки формул данных молекул были пакетно модифицированы путем включения в их состав концевых участков соответствующих линкерных групп. Проведён докинг полученной библиотеки в решётки докинга вершин доменов C1 и C2. Величины Glidescore для кандидатных лигандов (Рис. 10) соответствовали области значений Glidescore для конформеров L3 и L4 и для выбранных на первом этапе докинга кандидатов из библиотеки Asinex.



**Рисунок 10. Структурные формулы модифицированных кандидатных лигандов, отобранных из библиотеки химических соединений «ChemBridge».**

Таким образом, была получена линия-продуцент фVIII свертываемости крови с исключительно высокой удельной продуктивностью, разработаны оригинальные подходы к очистке продукта и продемонстрировано, что очищенный фVIII, секретируемый данной клеточной линией, может быть очищен с высоким выходом.

### **5. Ко-экспрессия гена целевого белка и вспомогательных генов на примере фактора свертывания крови IX**

Фактор IX (фIX) – это профермент сериновой протеазы каскада свёртывания крови, которая в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  и мембранных фосфолипидов гидролизует связь аргинин-изолейцин в молекуле фX с образованием активированного фX (фХа). Нековалентный комплекс факторов IXa, VIIIa и X, связанных с фосфолипидной мембраной (теназа) является основным элементом петли положительной обратной связи каскада свёртывания крови. Ген фIX, так же, как и ген фVIII, расположен на X-хромосоме. Врожденное отсутствие или низкий уровень функционально активного фIX приводят к развитию гемофилии В, частота ее возникновения – около 1 случая на 30 тысяч мужчин. Как и в случае описанной выше гемофилии А, единственным действенным методом лечения гемофилии В является заместительная терапия препаратами фIX, полученными из плазмы крови доноров или биотехнологическими методами.

Промышленный продуцент рекомбинантного фIX с достаточно высокой удельной продуктивностью был получен группой Р. Кауфмана на основе линии клеток CHO, общая концентрация секретируемого фIX достигала 188 мг/л, однако содержание прокоагуляционно активного белка составляло около 20 мг/л (2 МЕ/мл). Соответствующий лекарственный препарат фIX – нонаког альфа (торговое название Бенефикс) одобрен для применения в США и странах ЕС в 1997 г. Выделение и очистку фIX проводят в четыре хроматографические стадии, не используя

иммуноаффинную хроматографию, потенциально присутствующие вирусы удаляют методом нанофльтрации на фильтре с порогом отсечения 70 кДа.

Из всех посттрансляционных модификаций фИХ только  $\gamma$ -карбоксилирование в домене Gla непосредственно определяет прокоагуляционную активность фИХ. Во многих описанных в литературе случаях продуктивность систем гетерологической экспрессии гена фИХ человека определялась не уровнем биосинтеза собственно фИХ, а возможностями клетки-хозяина по его корректной посттрансляционной модификации. В частности, при экспрессии гена фИХ в клетках СНО при практически любом уровне удельной продуктивности обнаруживалось, что значительная доля секретируемого фИХ неактивна, так как содержит непроцессированный пропептид, полностью блокирующий функционирование Gla-домена. Восстановление нормального процессинга пропептида фИХ возможно при ко-экспрессии субтилизин/кексин-подобной конвертазы PACE/furin. Наилучший уровень удаления пропептида у секретируемого фИХ может быть достигнут при ко-экспрессии укороченного варианта PACE/furin человека, также секретируемого в культуральную среду.

Прокоагуляционная активность фИХ также определяется и уровнем  $\gamma$ -карбоксилирования остатков Glu в Gla-доме. В полностью активном фИХ первые 10 остатков Glu из 12 должны быть конвертированы в остатки Gla. В молекуле природного фИХ все 12 остатков Glu в Gla-доме полностью  $\gamma$ -карбоксилированы, в препаратах рекомбинантного фИХ уровень модификации двух последних остатков снижен, что не влияет на свойства фИХ.

Реакцию  $\gamma$ -карбоксилирования остатков Glu в молекулах витамин К-зависимых белков осуществляет фермент витамин К-зависимая  $\gamma$ -глутамин карбоксилаза (GGCX, EC 4.1.1.90), реакция происходит в просвете эндоплазматического ретикулума и предшествует транслокации про-белков в аппарат Гольджи. В качестве источника присоединяемой карбоксильной группы выступает растворенный углекислый газ, а донором электронов и кофактором GGСХ является восстановленная дигидрохиноновая форма витамина К ( $\text{KH}_2$ ), превращающаяся при прохождении реакции в 2,3-эпоксид хинона ( $\text{K}>\text{O}$ ). Реакция  $\gamma$ -карбоксилирования требует постоянного поддержания существенной концентрации  $\text{KH}_2$  в просвете эндоплазматического ретикулума. Восстановление  $\text{K}>\text{O}$  до  $\text{KH}_2$  в клетках позвоночных производится ферментным комплексом VKOR или VKORC (vitamin K oxireductase complex), основным компонентом которого является интегральный белок - субъединица 1 комплекса 2,3-эпоксиредуктазы витамина К (VKORC1, EC 1.1.4.1).

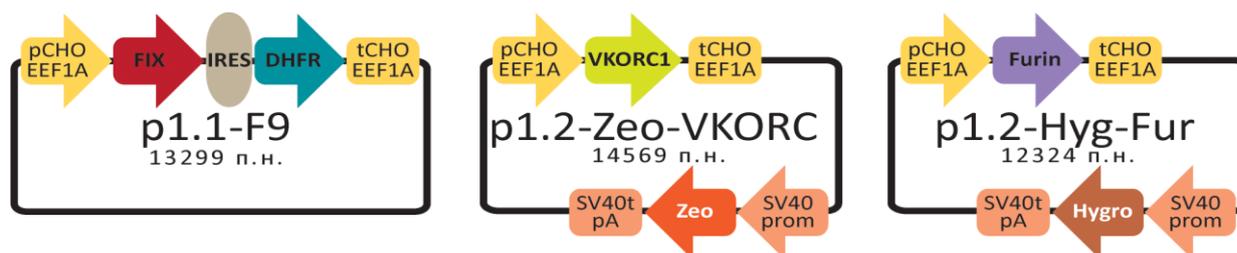
Для описанных в литературе систем экспрессии фИХ в клетках СНО, лимитированных уровнем процессинга пропептида целевого белка, уровень гамма-карбоксилирования, обеспечиваемый эндогенным ферментом VKORC1, оставался достаточным для получения фИХ с полной функциональной активностью. Тем не менее при существенном увеличении уровня экспрессии гена фИХ степень  $\gamma$ -карбоксилирования остатков Glu в Gla-доме может упасть. Обычным способом

увеличения витамин К-оксиредуктазной активности в культивируемых клетках является их трансфекция плазмидой, кодирующей известный ген VKORC1 человека, однако его относительная каталитическая эффективность в клетках других видов млекопитающих неочевидна.

Мы предположили, что наблюдаемая низкая активность комплекса VKOR в клетках линии CHO может быть вызвана не низкой каталитической эффективностью собственного VKORC1 китайского хомячка, а только лишь его недостаточным уровнем экспрессии. Таким образом, требуемый максимальный уровень секреции функционального фIX человека в клетках CHO может быть обеспечен путем ко-экспрессии целевого гена, растворимого варианта PACE/furin человека и VKORC1 китайского хомячка, при этом необходимый уровень экспрессии вспомогательных генов может быть определен при отборе клональных линий клеток-продуцентов по доле коагуляционно активных молекул фIX с удаленным пропептидом.

### 5.1. Получение и характеристика первичных линий-продуцентов фIX

ОПС фIX с добавленной синтетической консенсусной последовательностью Козак и блоком стоп-кодонов клонировали в экспрессионный вектор p1.1 с образованием экспрессионной плазмиды p1.1-F9 (Рис. 11).

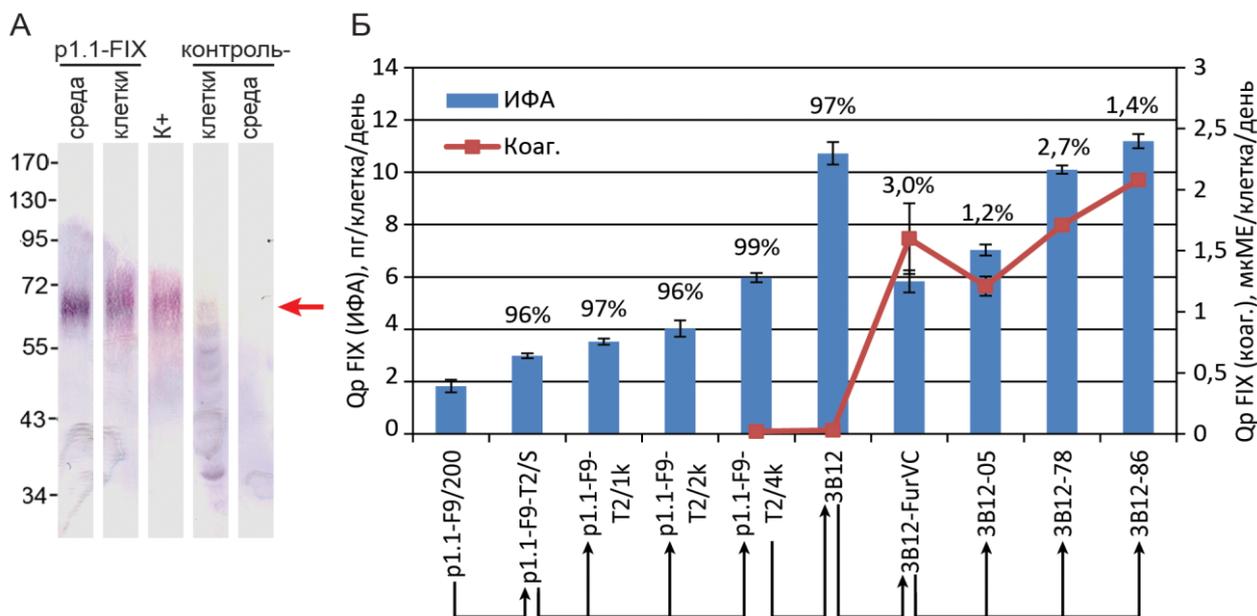


**Рисунок 11. Схемы экспрессионных плазмид p1.1-F9, p1.2-Zeo-VKORC, p1.2-Hyg-Fur.**

Обозначения: pCHO EEF1A - функциональный промотор гена EEF1A1, 5' нетранскрибируемая область этого гена и нетранскрибируемая область ДНК, фланкирующая этот ген; IRES – внутренний сайт связывания рибосом вируса энцефаломиокардита (EMCV); DHFR – открытая рамка считывания дигидрофолатредуктазы мыши; tCHO EEF1A - функциональный терминатор и сигнал полиаденилирования гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, 3' нетранскрибируемая область этого гена и нетранскрибируемая область, фланкирующая этот ген; фIX – ОПС фIX; VKORC1 - ОПС VKORC1 китайского хомячка; SV40 prom – область промотора вируса SV40; SV40t pA – терминатор и сигнал полиаденилирования вируса SV40; Zeo – ОПС гена *Sh ble* (*Streptoalloteichus hindustanus* bleomycin), обеспечивающего устойчивость к зеоцину; Furin - ОПС протеазы PACE/furin человека; Hygro – ОПС гигромицин фосфотрансферазы. Стрелками указаны направления действия промоторов и транскрипции генов.

Плазмиду p1.1-F9 линейризовали с разрушением гена бета-лактамазы и использовали для трансфекции клеток линии CHO DG44. Транзиентно трансфицированные клетки через 48 ч после трансфекции подвергали первичной селекции в присутствии трех различных концентраций МТХ – 50, 100, 200 нм. Во всех трех случаях получили стабильно трансфицированные популяции клеток с уровнями секреции фIX  $0,69 \pm 0,04$  мкг/мл,  $1,05 \pm 0,05$  мкг/мл и  $1,83 \pm 0,24$  мкг/мл. Поскольку максимальный титр фIX был зафиксирован для культуры, полученной в присутствии 200 нм МТХ,

для этой культуры проведен иммуноблоттинг внутриклеточного и секретированного фИХ (Рис. 12 А), продемонстрировавший отсутствие иммунореактивных полос фИХ с некорректной молекулярной массой, что косвенно свидетельствовало об отсутствии повреждений у интегрированных в геном клеток генетических кассет. Полученную поликлональную культуру использовали для клонирования клеток методом предельных разведений. Клональные линии-продуценты фИХ с максимальным титром продукта реадaptировали к суспензионным условиям культивирования в среде без нуклеотидных добавок и ингибиторов DHFR. Уровень секреции фИХ для трех наилучших полученных клональных линий составил  $11,9 \pm 0,4$  мкг/мл,  $12,3 \pm 0,4$  мкг/мл,  $9,9 \pm 0,3$  мкг/мл после 3 дней культивации. Для дальнейшей работы была выбрана клональная линия p1.1-F9-T2/S с удельной продуктивностью (Qp)  $2,99 \pm 0,06$  пг/клетка/день и временем удвоения 22,5 ч.



**Рисунок 12.** Целостность секретированного и внутриклеточного фИХ для линии клеток p1.1-F9-T2/S, уровни секреции фИХ и изменение прокоагуляционной активности для линий-продуцентов, филогения VKORC1 китайского хомячка. А - иммуноблоттинг секретируемого и внутриклеточного фИХ. Электрофорез в восстанавливающих условиях, детекция поликлональными антителами к фИХ, молекулярная масса указана в кДа; “К+” стандарт рекомбинантного фИХ, ”контроль-” - нетрансфицированные клетки CHO DG44. Положение полноразмерного фИХ обозначено стрелкой. Б - уровень секреции фИХ и степень отделения пропептида для популяций и клональных линий. Удельная продуктивность линий клеток, измеренная по ИФА, обозначена столбиками, левая шкала. Удельная продуктивность в терминах прокоагуляционной активности приведена как ломаная линия, правая шкала. Доля молекул фИХ с отделенным пропептидом, определенная по ИФА, в процентах, приведена над соответствующими столбиками; n=2. Стрелками обозначен порядок получения соответствующих линий и популяций клеток.

Продуктивность полученной клональной линии увеличивали при амплификации целевого гена под действием возрастающих концентраций МТХ. После повышения концентрации МТХ до 4 мкМ была получена олигоклональная линия клеток с Qp  $5,97 \pm 0,18$  пг/клетка/день и использована для второго клонирования методом предельных разведений. Среди 12 полученных наиболее

продуктивных клонов клеток, реадaptированных к суспензионной культивации, отобран клон p1.1-F9-T2/4к-3B12 (далее в тексте и на рисунках – 3B12) с Qp  $10,7 \pm 0,4$  пг/клетка/день и временем удвоения культуры 20,2 ч (Рис. 12 Б).

## 5.2. Ко-экспрессия генов PACE/furin и VKORC1

Для ко-экспрессии растворимого укороченного варианта PACE/furin человека применен вектор p1.2-HYG, аналогичный вектору p1.1, но содержащий расположенный вне контекста гена EEF1A ген гигромицин фосфотрансферазы под контролем промотора SV40, обеспечивающий устойчивость к антибиотику гигромицин Б (Рис. 13 Б). Для проведения оверэкспрессии эндогенного VKORC1 была клонирована OPC гена *vkorc1* из кДНК клеток CHO DG44 при помощи праймеров, гомологичных началу и концу OPC известного гена *vkorc1* мыши. Секвенирование клонированного продукта ПЦР выявило приблизительно одинаковый уровень гомологии *vkorc1* китайского хомячка с *vkorc1* мыши и человека. В последовательности VKORC1 китайского хомячка, в отличие от ортологов других млекопитающих, присутствует мотив RRR на границе первого трансмембранного домена.

Охарактеризованная область OPC гена *vkorc1* китайского хомячка депонирована в Genbank (AFG26681.1), а также переклонирована в вектор p1.2-Zeo с образованием плазмиды p1.2-Zeo-VKORC1 (Рис. 13 В). На основе того же экспрессионного вектора была создана контрольная плазида p1.2-Zeo-hVKORC1, содержащая область OPC *vkorc1* человека. Оверэкспрессия обоих ортологов *vkorc1* в клетках CHO привела к сильному увеличению оксиредуктазной активности в лизате клеток (Таб. 5), при этом VKORC1 китайского хомячка обеспечивал втрое большую удельную ферментативную активность, чем VKORC1 человека при практически одинаковом числе копий интегрированных кассет -  $5,8 \pm 0,3$  копии/геном и  $5,5 \pm 0,5$  копии/геном для генов *vkorc1* китайского хомячка и человека, соответственно.

**Таблица 5. Уровень активности VKORC1 для стабильно трансфицированных клеток.**

Название плазмиды	-	p1.2-Zeo-VKORC1	p1.2-Zeo-hVKORC1
Удельная активность VKORC1, % конверсии субстрата на 1 мг/мл общего белка в лизате за 1 ч	0,38	9,21	3,03
Относительный уровень увеличения активности VKORC1, раз	-	24,2	8,0

Примечание: расчеты удельной активности выполнены для диапазонов линейной зависимости уровня конверсии субстрата от концентраций общего белка.

Уровень транскрипции генов обоих ортологов VKORC1 также не имел существенных отличий – уровень мРНК VKORC1 китайского хомячка составил  $0,12 \pm 0,03\%$  от уровня мРНК  $\beta$ -актина; уровень мРНК VKORC1 человека -  $0,09 \pm 0,01$ ;  $P=0,16$ . Одновременно обнаружено, что для VKORC1 человека максимальная скорость конверсии субстрата  $VK > O$  составляет около 5% в час, а

для VKORC1 китайского хомячка – не менее 9% в час. Поскольку сверхэкспрессия аутологичного гена *vkorc1* в клетках СНО позволяет достичь максимальной витамин-К оксиредуктазной активности, этот вариант *vkorc1* использовали для ко-трансфекции линии клеток-продуцентов фІХ.

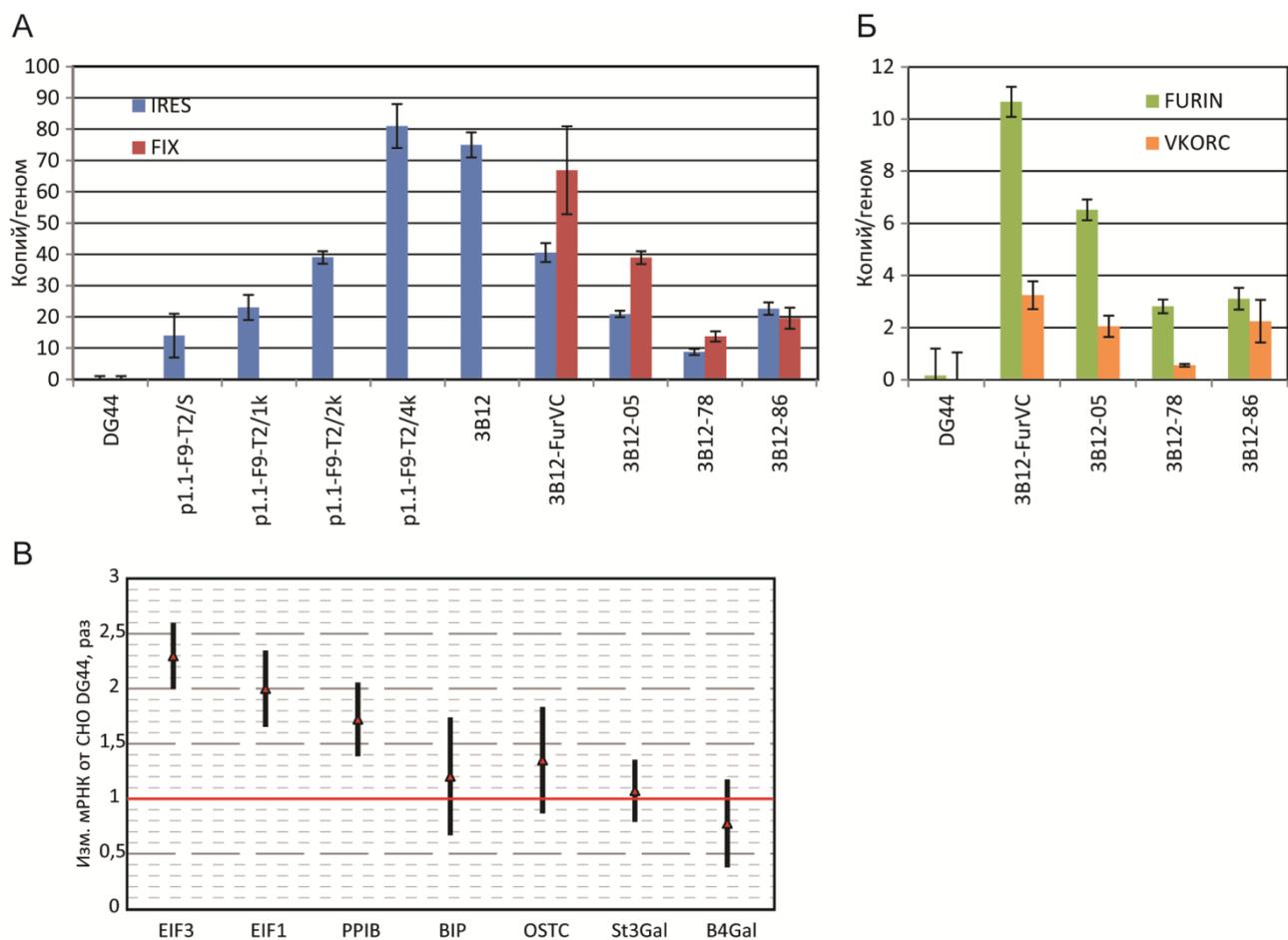
Клетки клональной линии 3В12 последовательно трансфицировали линейризованными плазмидами p1.2-Zeo-VKORC и p1.2-Hygro-Fur, для популяции стабильно трансфицированных клеток удельная прокоагуляционная активность фІХ в культуральной среде составила 27% от стандарта, а доля молекул фІХ с неотделенным пропептидом - только 3,1% по данным ИФА. Предположительно, активность растворимого PACE/furin человека в полученной популяции клеток была достаточной для практически полного отделения пропептида, однако уровень гамма-карбоксилирования в большей части клеток был недостаточен для корректного формирования Gla-домена фІХ.

Для выделения клеток, в которых максимально эффективно работают оба вспомогательных фермента, т.е. образуется биологически активный фІХ, провели клонирование полученной популяции клеток методом предельных разведений, используя в качестве критериев отбора перспективных клонов прокоагуляционную активность секретируемого фІХ и уровень пептидазной активности PACE/furin в культуральной среде. Пять из 12 отобранных клональных линий успешно реадаптировали к суспензионному культивированию в присутствии водорастворимого витамина К3, для всех клонов удельная прокоагуляционная активность фІХ составляла более 185 МЕ/мг. Среди этих пяти клонов определена основная линия 3В12-86 с Qp  $11,2 \pm 0,3$  пг/клетка/день и две запасные линии – 3В12-78 и 3В12-05.

### 5.3. Характеризация линии клеток 3В12-86

Копийность гена фІХ, области его селекционного маркера и вспомогательных генов в геноме линий-продуцентов и родительских популяций клеток определяли методом количественного ПЦР (Рис. 13 А, Б). Копийность областей ОРС фІХ и DHFR не имела достоверных отличий для всех исследованных объектов, то есть ни в одном из случаев не обнаружено признаков расщепления целевого гена и гена селекционного маркера, несмотря на амплификацию генетических кассет в геноме продуцентов. Копийность вспомогательных генов для всех полученных клональных линий была значительно ниже, чем копияность гена фІХ, поскольку отбор клонов клеток по критерию максимальной активности VKORC1 не проводили, а для PACE/furin провели только один раунд отбора, в котором была отобрана одна треть от всех полученных клонов клеток.

Для основной линии-продуцента 3В12-86 методом РТ-ПЦР оценено изменение уровня экспрессии нескольких генов домашнего хозяйства, связанных с биосинтезом и пост-трансляционным процессингом белков (Рис. 13 В). Ни для одного из проверенных генов не обнаружено значимого изменения уровня экспрессии, что указывает на отсутствие существенного изменения системы биосинтеза и процессинга белка клеток-хозяев при секреции фІХ с достигнутой продуктивностью.



**Рисунок 13. Копийность целевого гена и вспомогательных генов ферментов фурина и VKORC1 в геноме линий-продуцентов, изменение уровня экспрессии генов домашнего хозяйства для линии клеток 3B12-86 методом количественной ПЦР.**

Панель А – копийность гена *φIX* и области селекционного маркера (IRES). IRES – ампликон из области IRES и гена DHFR; *φIX* – ампликон из области OPC *φIX*.

Панель Б – копийность вспомогательных генов фурина и *vkorc1*. Обозначения – FURIN – ампликон из области OPC фурина, VKORC – ампликон из области OPC VKORC1.

Панель В - изменения в уровне экспрессии генов CHO, связанных с процессами трансляции и пост-трансляционных модификаций синтезируемых белков в сравнении с нетрансфицированными клетками CHO DG44. Нормализация результатов по уровню мРНК бета-актина. Обозначения: EIF1 - эукариотический фактор инициации трансляции 1а, EIF3 EIF1 - эукариотический фактор инициации трансляции 3, PPIB- пептидилпролил изомераза В, BIP – иммуноглобулин-связывающий белок (Grp78); OSTC – олигосахаридтрансфераза; St3gal – бета-галактозид альфа-2,3-сиаилитрансфераза 3; B4gal - бета-1,4-галактозилтрансфераза 1. n=3-4, приведены данные одного репрезентативного измерения из трех.\

Методом ПЦР с геномной ДНК клеток линии 3B12-86 и праймеров к областям промотора и терминатора использованных экспрессионных векторов было показано, что преобладающие продукты ПЦР имеют корректную молекулярную массу – везде выявляется продукт размером 2942 п.о., соответствующий p1.1-F9., что указывает на отсутствие протяженных делеций или инсерций в области OPC *φIX* или мутаций, приводящих к изменению сплайсинга мРНК *φIX*. Блоттинг по Саузерну для геномной ДНК из линии 3B12-86 с зондом, направленным к области OPC *φIX*, выявил

один рестриктивный фрагмент длиной 1921 п.о. что указывает на отсутствие в геноме продуцента генетических кассет, встроившихся с разрывом ДНК в области ОРС фІХ. Псевдо-Нозерн блоттинг, проведенный для кДНК, полученных из линий ЗВ12-86 и ЗВ12-78, также выявил только мРНК фІХ ожидаемой длины. Отсутствие мутаций в области ОРС фІХ также подтверждено при ПЦР-амплификации всей области ОРС фІХ из геномной ДНК линии ЗВ12-86, клонирования ампликона и секвенирования вставки для трех плазмидных клонов. Во всех случаях не наблюдалось изменений в последовательности ОРС фІХ.

#### **5.4. Выделение и очистка фІХ**

Фактор ІХ из кондиционированной среды линии ЗВ12-86 выделяли при помощи трех последовательных стадий – мультимодальной хроматографии с сорбентом Сарто ММС, позволяющим извлекать фІХ из кондиционированной среды без ее дополнительной подготовки; псевдо-аффинной хроматографии на анионообменном сорбенте Сарто Q с элюцией прокоагуляционно активных молекул фІХ хлоридом кальция при низкой ионной силе и финишной аффинной хроматографии на специализированном сорбенте Сарто Нерагін, отделяющем гепарин-связывающие белки от остальных молекул. Суммарный выход продукта составил 32%, удельная прокоагуляционная активность фІХ была увеличена при очистке со 185 МЕ/мг до более чем 230 МЕ/мг, что соответствует показателям известного лекарственного препарата рекомбинантного фІХ.

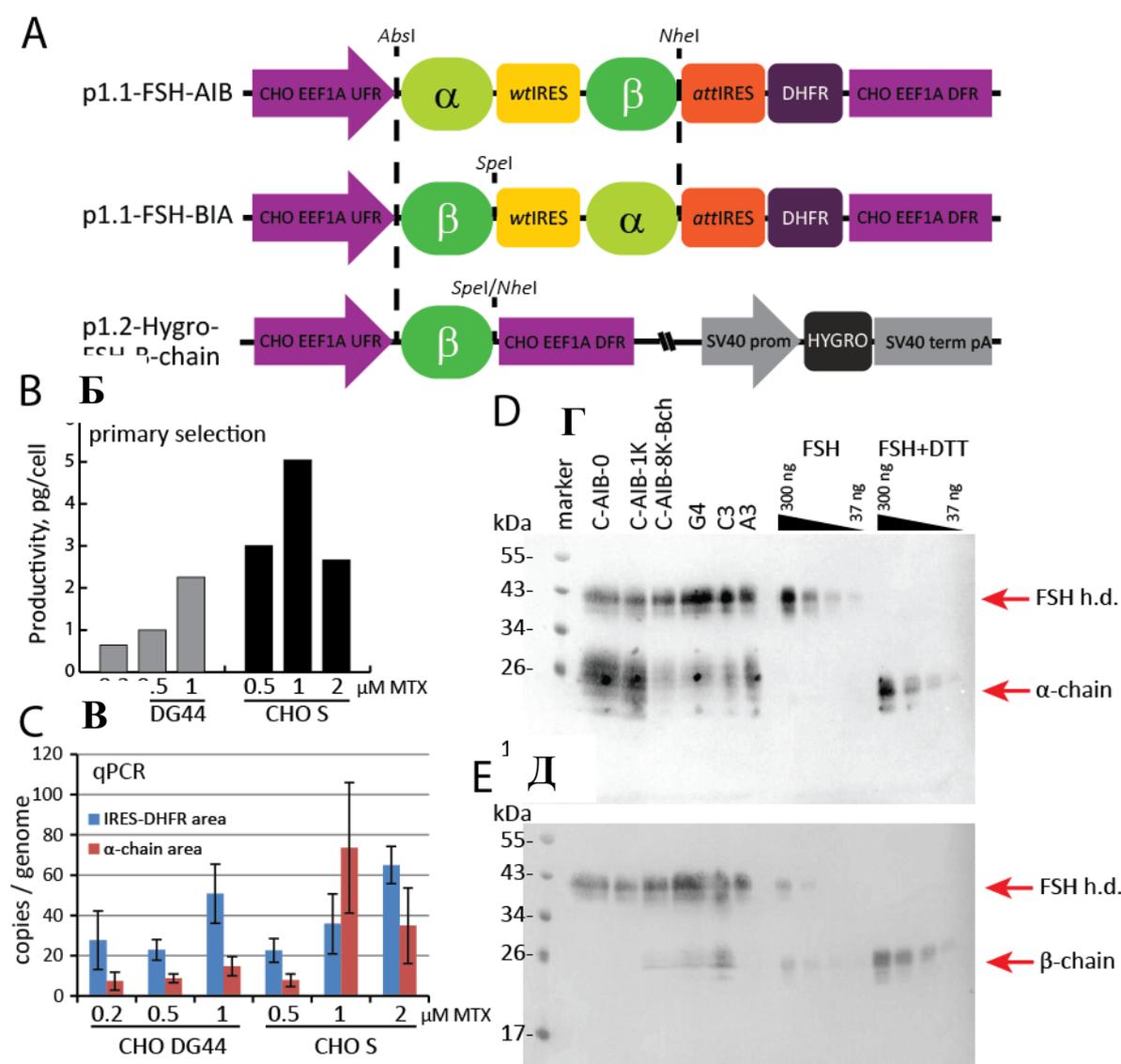
Таким образом, вектор р1.1 и его производные могут быть использованы для высококопийной интеграции целевого гена и последующей интеграции небольшого числа копий вспомогательных генов. Такая задача является довольно типичной при получении в культивируемых клетках рекомбинантных белков с необычными пост-трансляционными модификациями. Для случая фІХ удалось получить линию-продуцент с высокой продуктивностью, секретирующей фІХ с практически полной биологической активностью. Для очищенного до фармакопейных показателей фІХ в условиях доклинических исследований (ФИБХ РАН) на животных продемонстрирована безопасность созданного прототипа воспроизведенного лекарственного средства.

#### **6. Ко-экспрессия пары генов, образующих гетеродимерный гликопротеин, при помощи трицистронного вектора на примере фолликулостимулирующего гормона человека.**

Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) - гормон гипофиза, относящийся совместно с лютеинизирующим гормоном к гонадотропным гормонам. ФСГ представляет собой гликопротеин с молекулярной массой полипептидных цепей около 30 кДа и состоящий из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц;  $\alpha$ -субъединица ФСГ содержит 92 аминокислоты и 5 внутримолекулярных дисульфидных связей и одинакова для всех гликопротеидных гормонов. Бета-субъединица ФСГ содержит 111 аминокислотных остатков и 6 внутримолекулярных дисульфидных связей и определяет биологические свойства ФСГ. Около 30% веса молекулы ФСГ составляют углеводные остатки (2+2

сайта N-гликозилирования), в основном представленные четырехантенными структурами со значительным уровнем терминального сиалирования. В случае ФСГ, в отличие от, например, эритропоэтина, взаимодействие гормона с рецептором зависит от состава N-связанных олигосахаридов и наиболее кислые формы ФСГ обладают меньшим сродством к рецептору, чем более нейтральные. Одновременно с этим кислые формы ФСГ так же, как и кислые формы эритропоэтина и других сигнальных гликопротеинов, обладают значительно бóльшим периодом полувыведения, чем менее кислые и нейтральные. Вследствие этого, лекарственный препарат ФСГ должен содержать смесь изогормонов с различным уровнем терминального сиалирования N-гликанов. Лекарственные препараты ФСГ в основном применяются для стимуляции фолликулообразования при проведении *in vitro* фертилизации, при этом препараты на основе рекомбинантного ФСГ существенно превосходят препараты на основе ФСГ из природного сырья за счет полного отсутствия балластных белков и постоянной удельной активности. Большинство лекарственных препаратов рекомбинантного ФСГ получено на основе клеток линии CHO.

Для проведения координированной экспрессии пары генов получили плазмиды p1.1-FSH-A1B и p1.1-FSH-B1A, в которых области ОРС цепей ФСГ соединены областью EMCV IRES дикого типа, позволявшего максимизировать уровень реинициации трансляции для второго цистрона данной мРНК (Рис. 14 А). В результате трансфекции данных плазмид в клетки линий CHO DG-44 и CHO S (содержащей интактные аллели гена *dhfr*) обнаружено, что плазида p1.1-FSH-B1A не дает детектируемой секреции ФСГ для обеих линий клеток, а в случае плазмиды p1.1-FSH-A1B уровень секреции ФСГ значительно выше для клеток линии CHO S, чем для CHO DG-44 (Рис 14 Б), что коррелировало с относительными числами копий целевых генов в геноме продуцентов (Рис 14 В). По данным иммуноблоттинга, в культуральной жидкости проходило накопление смеси гетеродимерного ФСГ и свободной альфа-цепи ФСГ, после проведения амплификации целевых генов под действием МТХ уровень секреции ФСГ удвоился, но отношение уровней секреции гетеродимерного гормона и альфа-цепи не изменилось (Рис 14 Г, Д).



**Рисунок 14. Схема генетических конструкций и характеристика первичных стабильно трансформированных клеточных популяций.**

**А** - Схемы экспрессионных плазмид. CHO EEF1A1 UFR – апстрим фланкирующая область гена EEF1A1 (промотор гена и 5'-UTR), DFR – даунстрим фланкирующая область (терминатор и сигнал полиаденилирования, фланкированный 3'-UTR); attEMCVIRES - аттенюированный внутренний сайт связывания рибосомы вируса энцефаломиокардита; SV40prom - промотор полиомавируса обезьяны 40; SV40term, pA - терминатор и сигнал полиаденилирования полиомавируса обезьяны 40, Hygro - фосфотрансфераза гигромицина В. Сайты рестрикции, используемые для клонирования, выделены курсивом. **Б** - уровень секреции ФСГ в стабильно трансформированных клеточных популяциях методом ИФА. Данные средние, n = 2.

**В** – ПЦР-РВ - анализ числа копий экспрессионной кассеты для гаплоидного генома. Область IRES-DHFR - пара праймеров RT-ID-F, RT-ID-R; область альфа-цепи - пара праймеров SQ-FA-F, SQ-FA-R. Все данные нормализованы к числу копий гена PPIB. Столбики ошибок представляют стандартное отклонение, n = 3.

**Г** - Вестерн-блоттинг секретируемого ФСГ в средах с культурами антител к альфа-цепи. C-AIB-0.5K - стабильно трансфицированная клеточная линия CHO S 0,5 мкМ MTX, C-AIB-1K - поликлональная популяция, полученная при 1 мкМ MTX, C-AIB-8K-Bch - поликлональная популяция, амплифицированная до 8 мкМ MTX и дополнительно трансфицированная плазмидой p1.2-Hygro-FSH-β-цепи; G4 - моноклональная клеточная линия C-P1.3-FSH-G4, C3 - моноклональная клеточная линия C-P1.3-FSH-C3, A3 - моноклональная клеточная линия C-P1.3-FSH-A3; FSH - Gonal F, FSH + DTT - Gonal F, предварительно обработанный 10 мМ DTT, «FSH h.d.» - гетеродимер FSH. SDS-PAGE в невозстанавливающих условиях, молекулярные массы приведены в кДа.

**Д** - Вестерн-блоттинг секретируемого ФСГ, антитела к бета-цепи. Те же образцы для панели D, другая мембрана.

Избыток свободной секретируемой альфа-субъединицы скорректировали путем трансфекции клеток дополнительной плазмидой p1.2-Hygro-FSH-B-chain, кодирующей бета-субъединицу ФСГ. Полученные из данной популяции клеток клональные клеточные линии секретируют в основном гетеродимерный ФСГ и обладали удельной продуктивностью до  $12,3 \pm 1,7$  пг / клетка / день. Кандидатная клональная клеточная линия C-P1.3-FSH-G4 поддерживала постоянную удельную продуктивность в течение по меньшей мере 2 месяцев культивирования в отсутствие селекционного давления, то есть была пригодна для промышленного использования.

Относительно высокая удельная продуктивность линии C-P1.3-FSH-G4 позволила на порядок увеличить конечную концентрацию ФСГ в ростовой среде по сравнению с ранее существовавшими линиями-продуцентами и упростить промышленный процесс производства ФСГ, а именно проводить все операции выделения и очистки продукта на одном промышленном жидкостном хроматографе и не использовать машины для ультрафильтрации, что, в свою очередь, позволяет крайне существенно уменьшить затраты на организацию такого промышленного производства и уменьшить операционные расходы на получение партий продукта. Полученный в лабораторных условиях очищенный ФСГ соответствовал известным фармакопейным требованиям по содержанию родственных и посторонних примесей, проявлял достаточную удельную биоактивность в тестах *in vivo* и *in vitro*. Детальный анализ N-связанных олигосахаридов показал, что в исследуемом препарате ФСГ присутствуют в основном гликаны комплексного типа, умеренно фукозилированные и с сильно ветвящейся структурой. Средний заряд N-гликана составил около -2, кислые моносахаридные группы были в основном представлены сиаловыми кислотами (94,6%), среди которых «не человеческий» вариант N-гликолил нейрамина кислота составлял менее 1%. Такое распределение структур, состава и зарядов N-гликанов сравнимо с ранее опубликованными данными для рекомбинантного ФСГ из клеток CHO.

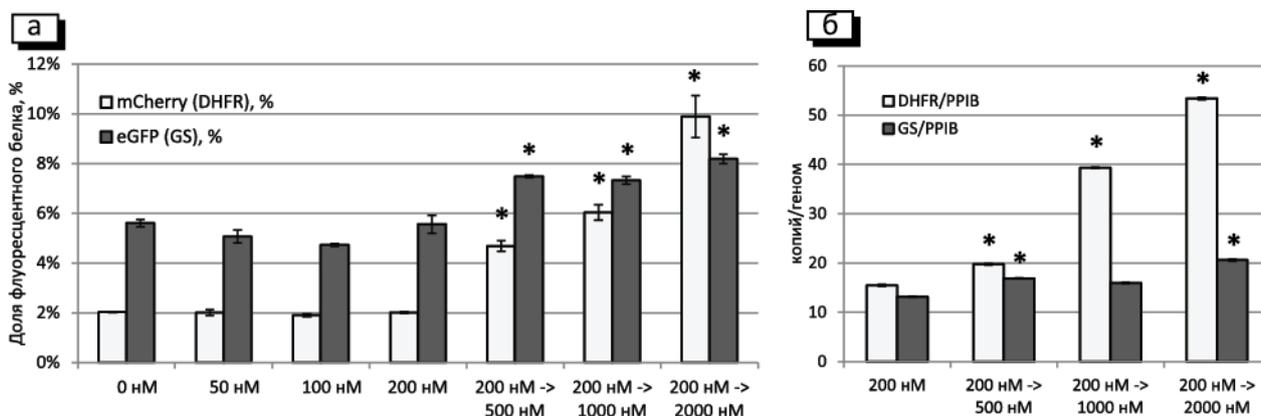
Для полученного из клеток линии C-P1.3-FSH-G4 очищенного ФСГ разработана оригинальная лекарственная композиция, включающая 10 мМ фосфатов натрия, pH=7,0, 68,46 г/л сахарозы, 0,5 г/л L-метионина и 0,02% Твин-20 и показано, что ФСГ в данном растворе сохраняет полную биологическую активность и не выходит за рамки фармакопейных требований по уровням родственных примесей при хранении в течение 2,5 лет при температуре +2 - +8 оС в картриджах для шприц-ручек. Полученные в условиях опытно-промышленного производства в ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи партии ФСГ использовали в доклинических и клинических исследованиях (код исследования NCT03088137 в базе данных [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)), продемонстрировавших, что данный биоаналог не проявляет повышенной токсичности, обладает сходной с оригинальным препаратом ФСГ Гонал-ф фармакокинетикой и фармакодинамикой и сравнимой с Гонал-ф клинической эффективностью. В настоящий момент идет рассмотрение полного регистрационного досье лекарственного препарата ФСГ Примапур в Минздраве РФ.

## 7. Одновременная амплификация пары экспрессионных плазмид в геноме клеток-продуцентов. Получение продуцентов лютеинизирующего гормона

На примере ФСГ показано, что при расположении областей OPC цепей гетеродимерного белка в составе одного искусственного оперона и их соединении EMCV IRES дикого типа наблюдается преимущественная секреция клетками свободной альфа-цепи ФСГ (первый цистрон) и для изменения паттерна секреции к преимущественному накоплению в среде гетеродимерного ФСГ требуется введение в геном клеток дополнительной плазмиды, кодирующей только бета-цепь ФСГ. Предположено, что секреция преимущественно гетеродимерного белка будет возможна при ко-трансфекции клеток CHO парой плазмид на основе вектора p1.1, кодирующих цепи гетеродимерного белка и селекционные маркеры DHFR и глутаминсинтетазу (GS) и их последующей ко-амплификации под действием возрастающих концентраций селекционных агентов – MTX и ингибитора GS метионилсульфоксимины (MSX).

### 7.1. Возможность ко-амплификации пары плазмид на примере модельных флуоресцентных белков

Для пары флуоресцентных белков – eGFP и mCherry получены плазмиды p1.1-Cherry и p1.2-GS-eGFP и показано, что векторы семейства p1.1 с селекционными маркерами DHFR и GS при ко-трансфекции клеток линии CHO DG44 позволяют получить поликлональную популяцию, в которой около 70% клеток экспрессируют оба гена. Последующая одностадийная амплификация под действием MTX позволяет увеличить уровень экспрессии обоих интегрированных генов до 8,2% eGFP, 9,9% mCherry от общего белка, что соответствует увеличению копийности интегрированных в геном кассет. (Рис. 15). Разработанный метод может быть использован для получения стабильных линий-продуцентов функциональных гетеродимерных белков, в частности, гормонов и терапевтических антител.



**Рисунок 15. Содержание флуоресцентных белков и копийность интегрированных генетических кассет для стабильно трансфицированных и прошедших амплификацию клеточных популяций.** (а) – доли флуоресцентных белков в общем внутриклеточном белке клеток. Абсолютные концентрации флуоресцентных белков определены против стандартов, общий белок - по Брэдфорд.

Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям,  $n=3$ ; приведено 1 репрезентативное измерение из трех. (б) - Копийность областей селекционных маркеров в геноме стабильно трансфицированных популяций, определенная методом ПЦР-РВ. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям,  $n=3$ ; приведено 1 репрезентативное измерение из трех, нормирование проведено по ампликону из области гена *PPIB*, однокопийного по данным секвенирования генома CHO. Звездочками обозначено наличие статистически значимого (критерий Стьюдента,  $p<0,05$ ) отличия параметра со значением для образца «200 нм».

## 7.2. Многостадийная ко-амплификация пары плазмид на примере лютеинизирующего гормона

Лекарственные препараты ЛГ используются в клинической практике при терапии бесплодия одновременно с препаратами ФСГ, в первую очередь при проведении экстракорпорального оплодотворения. Так же как и ФСГ, ЛГ для первых лекарственных препаратов выделяли из мочи менопаузальных женщин, впоследствии были получены препараты полностью очищенного рекомбинантного ЛГ. Строение ЛГ сходно с ФСГ, их альфа-субъединица полностью одинакова, а бета-субъединица ЛГ практически не имеет гомологии с бета-субъединицей ФСГ, вследствие чего ЛГ взаимодействует с иным рецептором. Используемые в клинической практике варианты лекарственных препаратов рекомбинантного ЛГ получают в клетках CHO. Поскольку клеточные линии – продуценты оригинальных лекарственных препаратов ЛГ были созданы более 20 лет назад, их удельная продуктивность была достаточно низкой. Методы получения этих линий не являются оптимальными для создания линий-продуцентов воспроизведенных препаратов ЛГ, для которых исходно предполагаются значительно более низкие затраты на процесс производства целевого белка.

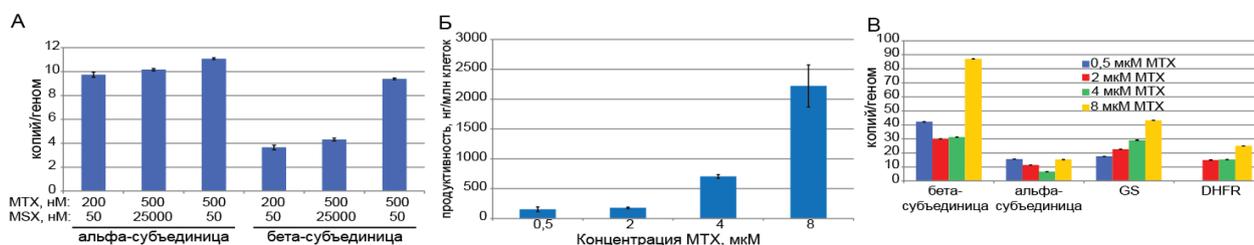
Для согласованной экспрессии генов субъединиц ЛГ в клетках CHO получено 2 пары плазмид – p1.1-LH- $\alpha$  + p1.2-GS-LH- $\beta$  (вариант LHA) и p1.1-LH- $\beta$  + p1.2-GS-LH- $\alpha$  (вариант LHB). Эти пары трансфицировали в клетки линии CHO DG-44, уровни секреции ЛГ приведены в Таб. 6.

**Таблица 6. Основные параметры популяций клеток, трансфицированных парами плазмид LHA и LHB.**

Пара плазмид	LHA	LHB
Эффективность трансфекции, %	20	46
Титр ЛГ через 48 ч после трансфекции, нг/мл	0,8	17
Продуктивность популяций клеток через 48 ч после трансфекции, нг/млн клеток	4,9	180
Удельная продуктивность в стабильно трансфицированных популяциях, пг/клетка/день	0,297	0,103
Время удвоения клеток, ч	48,5	37

Поскольку предполагалась более быстрая амплификация в геноме плазмид с маркером DHFR, для многостадийной амплификации выбрана стабильно трансфицированная популяция клеток LHB. Исследована возможность амплификации или вторичной селекции клеток в поликлональной популяции с концентрацией MSX увеличенной до 25 мкМ при одновременном увеличении концентрации MTX до 500 нм. Обнаружено, что одновременное увеличение концентраций двух

селекционных агентов MSX и MTX дает меньший прирост копийности целевых генов по сравнению с увеличением концентрации одного MTX (Рис. 16 А). Амплификацию целевых генов в поликлональной культуре вели путем последовательного повышения концентрации MTX при постоянной концентрации MSX 50 нМ (Рис. 16 Б). После проведения 4-х шагов амплификации при конечной концентрации MTX 8 мкМ получена популяция клеток с удельной продуктивностью 2,2 пг/клетка.



**Рисунок 16. Динамика копийности генов альфа- и бета- субъединиц ЛГ в геноме стабильно трансфицированных клеток СНО и продуктивность популяций клеток при увеличении концентрации MTX и MSX. (А) Динамика копийности генов при одновременном повышении уровней MTX и MSX. (Б) Изменение продуктивности клеток при последовательном повышении концентрации MTX. (В) Зависимость копийности генетических конструкций в геноме от концентрации MTX методом ПЦР-РВ. Данные приведены как среднее, n=3-4 для ПЦР-РВ, n=2 для ИФА, планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению.**

Параллельно с этим из первичной популяции стабильно трансфицированных клеток получили клональные линии клеток и для 6 линий с наибольшей продуктивностью проведен один шаг геномной амплификации. Только для одной линии из 6 наблюдалось увеличение удельной продуктивности клеток, такой способ получения высокопродуктивных продуцентов, по-видимому, непригоден для используемых нами плазмидных векторов р1.1.

Потенциально промышленно пригодные клеточные линии, секретирующие значительные количества гетеродимерного ЛГ без значимой примеси свободной субъединицы, могут быть получены при помощи пары плазмидных векторов, кодирующих гены субъединиц ЛГ и селекционные маркеры DHFR или GS. Ко-трансфекция плазмид и последующая их амплификация в геноме клеток-продуцентов под действием MTX позволяет многократно увеличить уровень биосинтеза обеих субъединиц ЛГ.

## 8. Создание искусственных гликопротеидов методом химической конъюгации с полисиаловой кислотой

В некоторых случаях негликозилированный или слабо гликозилированный белок может быть химически модифицирован путем конъюгации с гомополимером сиаловой кислоты. Такие конъюгаты имеют многократно увеличенный период полувыведения из системной циркуляции за счет увеличения веса и размера белковой молекулы и в этом качестве могут быть использованы в клинической практике. В данной работе в качестве полисиаловой кислоты использовали гомополимер

N-ацетилнейраминовой кислоты, выделяемый из клеточной стенки *E.coli* и активированный до альдегидной формы окислением иодидом натрия.

### 8.1. Получение чистого препарата конъюгата инсулина и полисиаловой кислоты

Общий метод конъюгации инсулина и окисленной полисиаловой кислоты предложен проф. Грегориадисом и сотрудниками и состоял в проведении реакции между N-концевыми аминогруппами в составе цепей инсулина и альдегидными группами, находящимися на конце полимера сиаловой кислоты. Образующееся основание Шиффа подвергалось восстановлению до вторичного амина при помощи цианоборгидрида натрия. Данная химическая реакция оставалась достаточно специфичной при ее проведении при слабокислом pH, однако разделение одно- и дву-замещенных вариантов инсулина и даже отделение остаточного свободного инсулина от однозамещенного конъюгата не было достигнуто.

В ходе настоящей работы уточнен метод синтеза конъюгата инсулина и разработан процесс его очистки, приводящий к получению гомогенного продукта. Показано, что полностью очищенный конъюгат инсулина и полисиаловой кислоты (Ins-PSA), в отличие от свободного инсулина и Ins-PSA, прошедшего только исходный процесс очистки, обладает большим гипогликемическим действием через 120 мин после введения, чем через 40 мин (Табл. 7) и, вследствие этого, может применяться в значительно больших дозировках без токсического эффекта для животных.

**Таблица 7.** Биологическая активность Ins-PSA при внутривенном введении мышам.

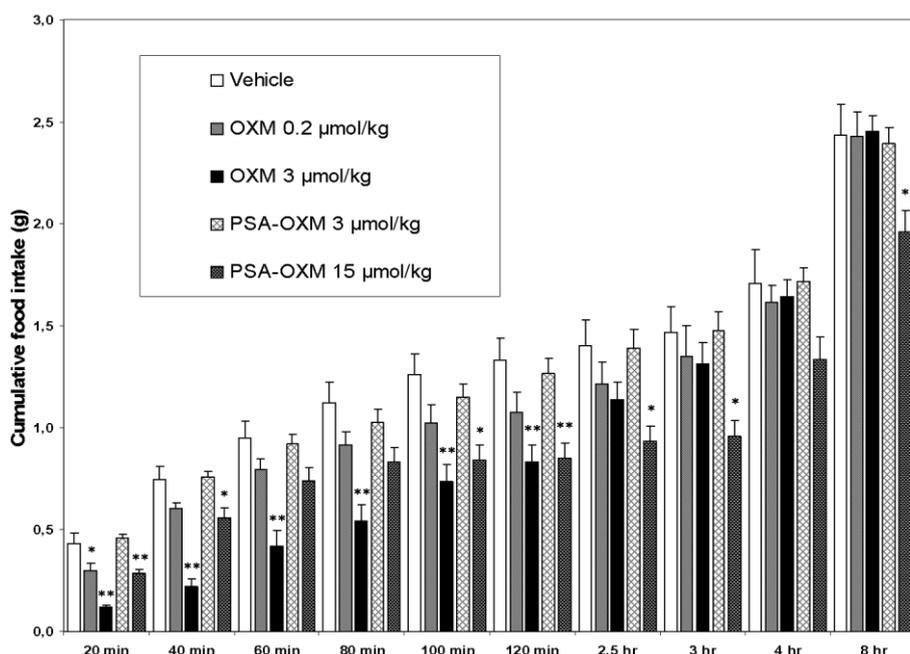
Образец	Падение концентрации глюкозы в крови на 40 мин, %	Падение концентрации глюкозы в крови на 120 мин, %
Интактный инсулин человека, 0,08 МЕ*/мл	37	0
Ins-PSA, исходный процесс очистки, 1,2 МЕ/мл	65	40
Ins-PSA полностью очищенный, 1,2 МЕ/мл	42	52
Ins-PSA полностью очищенный, 6 МЕ/мл	65	54
Плацебо-раствор	0	0

\* 1 МЕ инсулина во всех случаях – 1/27 часть от 1 мг инсулина

### 8.2. Конъюгат оксинтомодулина и полисиаловой кислоты

Полипептидный гормон кишечника оксинтомодулин (ОХМ) относится к семейству глюкагона, действует как один из сигналов насыщения и обладает терапевтическим потенциалом в качестве средства для контроля аппетита. Полипептид ОХМ обладает очень маленьким временем полужизни в системной циркуляции, поэтому для клинического применения могут быть допущены только его производные с существенно увеличенным периодом полувыведения. Одним из таких способов пролонгирования действия полипептидов является их конъюгирование с полисиаловой кислотой. Установлено, что конъюгация ОХМ и PSA проходит только в области нейтрального и слабо кислого pH и единственной точкой конъюгации является N-концевая аминогруппа, находящаяся на остатке His. Конъюгат ОХМ-PSA очистили до видимой гомогенности при помощи двух стадий

хроматографии, анорексическое действие конъюгата проверили на мышинной модели с голоданием. Продемонстрировано, что однократная инъекция OXM-PSA в дозе 15 мкмоль/кг вызывала постоянное снижение потребления пищи в течение 8 часов ( $p < 0,05$ ), в отличие от интактного OXM, вызывавшего статистически достоверное снижение потребления пищи только в течение 120 мин после инъекции максимальной толерантной дозы (Рис. 19). Введение эквивалентной дозы свободной полисиаловой кислоты не вызывало изменения потребления пищи мышами. Также обнаружено, что конъюгат OXM-PSA полностью резистентен к действию аминопептидазы DPP-IV, преимущественно инактивирующей природный OXM *in vivo*, что может частично являться причиной его пролонгированного действия.



**Рисунок 17.** Анорексическое действие OXM-PSA при однократном введении мышам. \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ .

На примерах инсулина и окситомодулина продемонстрировано, что терапевтические свойства негликозилированных полипептидов могут быть существенно изменены при их конъюгации с природным гомополимерным полисахаридом, такие искусственные гликопротеиды частично сохраняли биоактивность и в опытах *in vivo* оказывали воздействие на животных в несколько раз дольше, чем интактные полипептиды.

## 9. Механизм взаимодействия каталитических антител с фосфоорганическими субстратами

Для ранее созданного в лаборатории биокатализа ИБХ РАН моноклонального антитела A5, ковалентно связывающего (катализирующего распад) несколько фосфоорганических соединений, проведен сайт-специфический мутагенез, позволяющий провести для его Fab-фрагмента определение кинетических параметров реакции с субстратами методами предстационарной кинетики. Созданы мутанты антитела A5 с заменами L-R51W и H-F100W в легкой цепи. Все четыре «триптофановых» мутанта получены в виде Fab-фрагментов в экспрессионной системе метилотрофных дрожжей *P.*

*Pastoris*. Установлено, что эффективность их взаимодействия с модельным фосфоорганическим веществом – фосфонатом X (п-нитрофенил 8 метил-8-азабицикло [3.2.1] октил фенилфосфонат) сравнима с интактным антителом A5. Методом кинетики в остановленной струе установлены значительные конформационные изменения в процессе модификации фосфонатом. Для определения химической специфичности Fab-фрагментов антител A5 и A17, отобранных как наиболее эффективные катализаторы распада фосфоната X, определены параметры взаимодействия биокатализаторов с панелью фосфорорганических соединений (Таб. 8).

**Таблица 8. Химические структуры и значения  $k_{cat}/k_{uncat}$  для реакций взаимодействия антител A17 и A5 с фосфорорганическими субстратами.**

Название и формула соединения	Значение $k_{cat}/k_{uncat}$ , $\times 10^{-3}$	
	A17	A5
<b>Фосфонат X</b> - п-нитрофенил 8метил-8-азабицикло[3.2.1]октил фенилфосфонат	0.47	0.4
<b>Фосфонат X-AEDANS</b>	0.27	0.22
<b>Параоксон</b> - O,O-диэтил O-(4-нитрофенил) фосфат	0.002	ND
<b>Фосфонат Y-MCA</b> – Этил (4-метил-2-оксо-2Н-хромен-7-ил) 4-(2,2,2-трифторацетиламино)бензил фосфонат	0.003	ND
<b>Soman-MCA</b> - 4-хлоро-2-оксо-2Н-хромен-7-ил (3,3-диметилбутан-2-ил) метилфосфонат	0.005	ND

ND – отношение  $k_{cat}/k_{uncat}$ ,  $\times 10^{-3} < 0.001$ , что соответствует ошибке эксперимента.

Установлено, что антитело A5 обладает высокой специфичностью к фосфонату X и его флуоресцентному производному X-AEDANS, в то время как активности в отношении параоксона не наблюдается. Исследуемые антитела A5 и A17 также не реагируют с такими субстратами, как зоман-MCA или фосфонат Y-MCA.

Поскольку наибольшие различия реакции антитела A5 с фосфонатом X наблюдаются на стадии нековалентного связывания субстрата, были проведены эксперименты по оценке кинетических параметров реакции в предстационарных условиях. Изменение внутренней триптофановой флуоресценции оценивали методом остановленной струи. Ранее данным методом показано, что реакции взаимодействия антитела A17 с фосфонатом X протекает в две стадии и при этом реализуется механизм индуцированного соответствия. Однако в случае антитела A5 изменений в триптофановой флуоресценции детектировать не удалось, что может быть связано как с реализацией другого, отличного от антитела A17, механизма нековалентного связывания фосфоната X, так и с отсутствием участия в реакции имеющихся остатков триптофана.

Для проверки мутантов антитела A5 создали генетические конструкции, содержащие кодоны триптофана в выбранных позициях. Как и антитело A5 дикого типа, мутанты A5k\_H-F100W, A5 $\lambda$ \_H-F100W, A5k\_L-R51W и A5 $\lambda$ \_L-R51W получали в дрожжевой системе *P. pastoris*. Сохранение

способности триптофановых мутантов к ковалентному взаимодействию с субстратом установлено по реакции с биотинилированным фосфонатом X (BtX) методом Вестерн-блоттинга.

Оценка эффективности взаимодействия триптофановых мутантов A5 с фосфонатом X представлена в таб. 9. Мутантные антитела в целом сохранили высокий уровень специфической активности. Антитело A5 взаимодействует с фосфонатом X по двухстадийному механизму индуцированного соответствия. Индивидуальные константы скорости первичного нековалентного связывания фосфоната X с мутантными антителами примерно в два раза ниже по сравнению с антителом A17, скорость второй стадии – подстройки активного центра – ниже в 2-5 раз (Таб. 9).

**Таблица 9. Сравнительный анализ кинетических параметров реакции мутантных Fab-фрагментов антител A5 и A17 с фосфонатом X в предстационарных условиях.**

Антитело	$k_{набл1},$ сек <sup>-1</sup>	$k_{набл2},$ сек <sup>-1</sup>	$K_{дис1},$ мкМ	$K_{дис2}$
A17κ	530 ± 90	130 ± 30	70 ± 10	3.3 ± 0.5
A17λ	580 ± 90	80 ± 20	30 ± 5	1.4 ± 0.3
A5κ L-R51W	250 ± 50	16 ± 5	240 ± 40	0.4 ± 0.1
A5λ L-R51W	255 ± 50	30 ± 8	260 ± 30	0.7 ± 0.1
A5κ H-F100W	200 ± 20	40 ± 5	60 ± 10	3.9 ± 0.5
A5λ H-F100W	205 ± 40	50 ± 10	55 ± 5	3.3 ± 0.4

Антитела A5 и A17, полученные с использованием подхода «реактибоди», являются перспективными кандидатами для создания на их основе каталитических антител для терапии отравлений ФОТ. Эффективность взаимодействия антител A17 и A5 по отношению к фосфонату X незначительно отличаются ( $k_i^{A17}/k_i^{A5} = 3.9$  и  $5.6$  для каппа и лямбда вариантов, соответственно), а по отношению к его флуоресцентному аналогу X-AEDANS отличия еще менее значимые.

Анализ окружения нуклеофильного остатка L-Y33 в антителе A5 позволил установить, что единственный остаток триптофана H-W92 активного центра расположен в глубине гидрофобного кармана и по всей видимости не участвует во взаимодействии с субстратом. Этот факт может объяснить отсутствие детекции изменения триптофановой флуоресценции в процессе реакции.

Взаимодействие антитела A5 с фосфонатом X реализуется через механизм индуцированного соответствия и сходно с таковым для антитела A17. Антитело A5 можно рассматривать как альтернативу антителу A17 для направленного изменения его функциональной активности. Наличие экспонированного реакционного остатка представляет больше вариантов для создания и проведения широкомасштабного скрининга виртуальных библиотек на основе антитела A5 с использованием технологии квантово-механических расчетов химических реакций.

## Заключение

В настоящей работе последовательно рассмотрены способы получения высокопродуктивных линий-продуцентов медицински значимых гликопротеидов. Установлено, что существенное увеличение удельной продуктивности клеток по сравнению с существующим мировым уровнем может быть достигнуто путем создания оригинальных векторных плазмид на основе некодирующих участков гена фактора элонгации трансляции 1 альфа (*EEF1A1*) китайского хомячка и фрагмента конкатемера длинного концевого повтора из вируса Эпштейн-Барр. Для данного типа экспрессионного вектора установлено, что он позволяет проводить многостадийную амплификацию генетических кассет в геноме клеток-продуцентов и получать высокопродуктивные клональные клеточные линии при анализе относительно небольшого (несколько сотен) числа клонов. Созданные векторные плазмиды позволяют получать высокопродуктивные клональные линии-продуценты как при трансфекции одной генетической конструкцией с двуцистронной или трицистронной матрицей, так и в ситуациях ко-трансфекций культивируемых клеток парами плазмид с различными селекционными маркерами и последовательных трансфекций нескольких плазмид.

Для кандидатных линий-продуцентов нескольких медицински значимых гликопротеидов показано, что высокая удельная продуктивность клеток сохраняется практически постоянной в течение 2-3 месяцев последовательного культивирования, что позволяет использовать данные клеточные линии в промышленном производстве соответствующих биоаналоговых лекарственных средств. Для полученных линий-продуцентов факторов свертывания крови VII, IX и ФСГ получены опытно-промышленные серии целевых белков, доклинические и клинические исследования, продемонстрировавшие безопасность и надлежащую биологическую активность продуктов.

Для полипептидных гормонов инсулина и оксинтомодулина разработаны способы их конъюгации с полисиаловой кислотой и очистки продуктов, позволяющие полностью удалить примеси неконъюгированных полипептидов и корректно исследовать биологическую активность получаемых конъюгатов на животных моделях. Для конъюгата оксинтомодулина с полисиаловой кислотой показано, что он, в отличие от интактного оксинтомодулина, сохраняет анорексигенную активность в течение нескольких часов после единственной инъекции на модели голодания крыс. Для случая ковалентно связывающих антиген антител A5 и A17 продемонстрировано, что их механизм реакции с фосфоорганическими веществами может быть описан как индуцированное соответствие.

Созданные плазмидные векторы семейства p1.1 и исследованные методы их применения могут быть использованы для получения высокопродуктивных клеточных линий, секретирующих фармацевтически значимые белки.

## **Выводы**

1. Показано, что векторная плаزمида, включающая некодирующие последовательности ДНК из области гена фактора элонгации трансляции 1 альфа (EEF1A1) китайского хомячка и фрагмент конкатемера длинного концевого повтора вируса Эпштейна-Барр (EBV-TR) интегрируется в геном клеток CHO с существенно повышенной вероятностью и позволяет эффективно экспрессировать гены целевых белков.
2. На примере линии-продуцента фактора VIII свертывания крови человека показано, что уровень секреции нестабильных гликопротеинов большого размера может быть многократно увеличен при использовании специализированного плазмидного вектора и многоступенчатой амплификации генетических кассет в геноме продуцентов.
3. На примере линии-продуцента фактора IX продемонстрировано, что разработанные плазмидные векторы могут быть успешно применены для последовательных трансфекций целевого гена и вспомогательных генов.
4. На примере фолликулостимулирующего гормона человека показано, что использование трицистронной матрицы, в которой открытые рамки считывания двух субъединиц гетеродимерного целевого белка соединены при помощи внутреннего сайта связывания рибосом вируса энцефаломиокардита (EMCV IRES), позволяет получить линии-продуценты гликопротеинов с исключительно высокой удельной продуктивностью и способностью секретировать преимущественно гетеродимерный целевой белок.
5. На примере лютеинизирующего гормона человека установлено, что разработанные векторные плазмиды позволяют вести ко-амплификацию пары целевых генов, один из которых связан с амплифицируемым маркером устойчивости, а второй – с неамплифицируемым маркером.
6. Разработаны принципы создания рекомбинантных полипептидов – прототипов лекарственных средств пролонгированного действия методом направленной конъюгации биополимерной молекулы полисиаловой кислоты.
7. Установлено, что каталитические антитела A5 и A17 образуют с фосфоорганическим веществом фосфонат X ковалентное соединение, при этом механизм реакции может быть описан как индуцированное соответствие.

## Список публикаций по теме диссертации

### Статьи в рецензируемых журналах:

1. Мацкевич В.А., Орлова Н.А., Воробьев И.И., Юрьев А.С., Воробьев А.И. Поиск низкомолекулярного лиганда для аффинной хроматографической очистки фактора свёртывания крови VIII человека молекулярным докингом *in silico* // **Математическая биология и биоинформатика** 2011. том 6, № 1, с. 14-22
2. Orlova NA, Orlov AV, Vorobiev II. A modular assembly cloning technique (aided by the BIOF software tool) for seamless and error-free assembly of long DNA fragments. // **BMC Research Notes** 2012, 5:303.
3. Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьев И.И., Юрьев А.С., Габибов А.Г., Воробьев А.И. Стабильная экспрессия рекомбинантного фактора свертывания крови VIII в клетках CHO с использованием амплификации трансгена, инициированной метотрексатом. // **Acta Naturae** (русскаяязычная версия), 2012, том 4, № 1 (12), с. 96-104
4. Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьев И.И., Габибов А.Г. Фактор свертывания крови IX для терапии гемофилии В.// **Acta Naturae** (русскаяязычная версия), 2012, том 4, № 2 (13), с. 62-75
5. Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьев И.И., Габибов А.Г., Воробьев А.И. Фактор свертывания крови VIII – от эволюции к терапии. // **Acta Naturae** (русскаяязычная версия), 2013, том 5, № 2 (17), с. 19-39
6. Vorobiev I, Matskevich V, Kovnir S, Orlova N, Knorre V, Jain S, Genkin D, Gabibov A, Miroshnikov A. Chemical polysialylation: Design of conjugated human oxynomodulin with a prolonged anorexic effect *in vivo*.// **Biochimie**. 2013 Feb;95(2):264-70.
7. Orlova NA, Kovnir SV, Hodak JA, Vorobiev II, Gabibov AG, Skryabin KG. Improved elongation factor-1alpha-based vectors for stable high-level expression of heterologous proteins in Chinese hamster ovary cells.// **BMC Biotechnol**. 2014 Jun 14;14:56.
8. Smirnov IV, Vorobiev II, Belogurov AA, Genkin DD, Deyev SM, Gabibov AG. Chemical Polysialylation of Recombinant Human Proteins. **Methods Mol Biol**. 2015;1321:389-404.
9. И. И. Воробьев, С. В. Ковнир, Н.А. Орлова, Ю.А. Ходак, М. А. Ползиков. Составы растворов биологически активного рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека // **Разработка и регистрация лекарственных средств** Т.13, №4, стр.123-126.
10. Воробьев И.И., Головина Е. О., Семихин А. С. Производство нового биоаналогового фоллитропина альфа в России - это уже реальность в 2017 году // **Акушерство, гинекология и репродукция**, 2017, том 11, № 3, с. 116-126.
11. Orlova N. A., Kovnir S. V., Gabibov A. G. and Vorobiev, I.I. (2017). "Stable high-level expression of factor VIII in Chinese hamster ovary cells in improved elongation factor-1 alpha-based system." **BMC Biotechnol** 17(1): 33.
12. Орлова Н.А., Ковнир С.В., Ходак Ю.А., Ползиков М.А., Воробьев И.И. Рекомбинантный лютеинизирующий гормон человека для терапии бесплодия: получение линий-продуцентов. // **Акушерство, гинекология и репродукция**. 2017. Т. 11(3). С. 33-42
13. Тюлькина Е.Е., Гордеев И.Г., Гребенкин Д.Ю., Казей В.А., Цикаришвили М.М., Лучинкина Е.Е., Абдулла Б.Х., Самандари С., Воробьев И.И., Шигабутдинов А.Ф., Ползиков М.А. Сравнительное рандомизированное перекрестное исследование переносимости и фармакокинетики препаратов Примапур и Гонал-ф при однократном подкожном введении здоровым добровольцам. // **Экспериментальная и клиническая фармакология**. 2017, Т. 80(4), С. 13-17
14. С.В. Ковнир, Н.А. Орлова, Ю.А. Ходак, М.П. Кондрашова, А.Г. Габибов , К.Г. Скрябин, А.И. Воробьев, И.И. Воробьев. Подходы к управляемой ко-амплификации генов для получения рекомбинантных белков терапевтического назначения: Исследование динамики инсерции и амплификации генетических кассет в геноме клеток яичника китайского хомячка при ко-экспрессии пары совместимых плазмид. **Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины**. 2017. Т.163 (2), С. 245-249.
15. Мокрушина Ю.А., Пипия С.О., Степанова А.В., Шамборант О.Г., Кнорре В.Д., Смирнов И.В., Габибов А.Г., Воробьев И.И. Особенности механизма взаимодействия каталитических антител с фосфоорганическими субстратами. **Молекулярная Биология**. 2017. Т. 51 (6), С. 830-839

16. Ковнир С.В., Орлова Н.А., Шахпаронов М.И., Скрыбин К.Г., Габибов А.Г., Воробьев И.И. Высокопродуктивная линия-продуцент фактора свертывания крови IX человека на основе клеток CHO. // *Acta Naturae (русскаяязычная версия)*. 2018. том 10. № 1(36). с. 55-69

**Тезисы:**

1. I.V. Smirnov, E.A. Surina, I. I. Vorobiev, M. E. Avakyan, T.M. Vasilieva, V.A. Makarov, O. G. Shamborant, N. A. Ponomarenko, A. G. Gabibiov. Large-scale expression and purification of recombinant human blood coagulation factor VII. // *Biocatalysis 2007: Fundamentals & Applications* (Moscow - St. Petersburg, 17-22.06.2007 г.)
2. Воробьев И. И., Безуглов В. В., Смирнов И. В., Шибанова Е. Д., Байрамашвили Д. И., Генкин Д. Д., Мирошников А.И. Промышленно пригодный метод синтеза и очистки конъюгата инсулина человека и полисиаловой кислоты – новой пролонгированной формы инсулина для лечения диабета // Сб. трудов IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (11-15.05.2008 г., Новосибирск, Российская Федерация). Новосибирск: изд-во «Арта», 2008. - С. СТРАНИЦЫ
3. Ковнир С.В., Воробьев И.И. Оптимизация экспрессии рекомбинантного фактора свертываемости крови VIII в стабильной линии животных клеток-продуцентов. // Тезисы докладов и сообщений Школы конференции «Методы культивирования клеток» СПб 6-10.10.2008 Цитология 2008 Том 50 №9 С. 808
4. Воробьев И.И., Орлова Н.А., Ковнир С.В. Методы получения рекомбинантного фактора свертываемости крови VIII. // Тезисы научно-практической конференции «Достижения в гематологии и трансфузиологии». Гематология и трансфузиология. 2009. Т.54, N1. С. 28-29
5. Воробьев И.И., Орлова Н.А., Ковнир С.В., Юрьев А.С., Воробьев А.И. Рекомбинантный фактор свертываемости крови VIII. // Сборник тезисов Российского симпозиума с международным участием «Биофарма – 2009 от науки к промышленности» (Турция. Анталия. 25-27 мая 2009 г.) С. 10-11
6. Воробьев И.И., Орлова Н.А., Ковнир С.В. Рекомбинантные факторы свертывания крови. // Материалы V Московского Международного Конгресса "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 16-20.03.2009 г.), часть 1. М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. 2009 – 536 с. С. 30-31
7. Мацкевич В. А., Орлова Н. А., Воробьев И. И., Юрьев А. С., Воробьев А. И. Поиск низкомолекулярного лиганда для афинной хроматографической очистки фактора свёртывания крови VIII человека молекулярным докинггом *in silico*. // Материалы III Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика», г.Пушино, 10-15.10.2010 г.: Доклады / Под ред. В.Д. Лахно – 288 с., С.164-165
8. Орлова Н.А., Ковнир С.В., Усакин Л.А., Воробьев И.И. Плазмидный вектор p1.1 для высокоэффективной стабильной экспрессии гетерологичных белков в культивируемых клетках китайского хомячка. // Биология – наука XXI века: 16-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 16 - 21 апреля 2012 года). Сборник тезисов. Стр. 137
9. Ковнир С.В., Орлова Н.А., Усакин Л.А., Воробьев И.И. Клеточные линии высокоэффективных продуцентов фактора свертывания крови IX человека, полученные при помощи бицистронного плазмидного вектора p1.1 // Биология – наука XXI века: 16-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 16 - 21.04.2012 года). Сборник тезисов. Стр. 260-261
10. Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьев И.И., Габибов А.Г., Воробьев А.И. Высокопродуктивная линия-продуцент фактора свертывания крови VIII человека на основе вектора с нетранслируемыми областями гена фактора элонгации трансляции 1 альфа китайского хомячка // Материалы Международной конференции «Биология – наука XXI века» (Москва, 24.05.2012 г.) Ред. Р.Г. Василев. М.: МАКС Пресс, 2012. – 1125 с. С. 655-656
11. Ковнир С.В., Орлова Н.А., Усакин Л.А., Воробьев И.И., Габибов А.Г. Генерация высокопродуктивных линий-продуцентов фактора свертывания крови фактора свертывания крови IX человека без использования стадий амплификации целевого гена. // Материалы Московской международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские

- биотехнологии» (Москва, 20-22.03.2012г.). М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2012 – 568 с., С. 112-113
12. Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьев И.И., Габибов А.Г., Воробьев А.И. Получение линии-продуцента фактора свертывания крови VIII человека с использованием нетранслируемых областей гена фактора элонгациитрансляции 1 альфа китайского хомячка // Материалы Московской международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии» (Москва, 20-22.03.2012г.). М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2012 – 568 с., С. 114-115
13. Воробьев И.И., Мацкевич В.А., Ковнир С.В. и др., Vorobiev I.I., Matskevich V.A., Kovnir S.V., Orlova N.A., Knorre V.D., Jain S., Genkin D.D., Gabibov A.G., Miroshnikov A.I. Ковалентная модификация оксинтомодулина человека полисиаловой кислотой приводит к увеличению продолжительности анорексигенного эффекта. // Материалы Московской международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии» (Москва, 20-22.03.2012г.). М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2012 – 568 с., С. 64-65
14. Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьев И.И. Оптимизация системы гетерологичной экспрессии фактора свертывания крови VIII человека // Сборник трудов конференции «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии» (Казань, 19-22.11.2012), Казань: Изд-во «Казанский Университет», 2013. - 357 с., С. 210-213.
15. Vorobiev I, Kovnir S, Orlova N, Knorre V, Jain S, Genkin D, Gabibov A., Miroshnikov A. Conjugate of human oxyntomodulin and polysialic acid has a prolonged anorexic effect in vivo. Federation of European Biochemical Societies Congress 2013 «Mechanisms in Biology» // 38th Federation of European Biochemical Societies Congress 2013 «Mechanisms in Biology» (6-11.07.2013, St Petersburg). FEBS Journal 280 (Suppl. 1). 2013. P. 332
16. Orlova N.A., Kovnir S.V., Vorobiev I.I., Vorobiev A.I., Gabibov A.G. Design of genetic elements and expression system optimization for high-level coagulation factor VIII production in mammalian cells // 38th Federation of European Biochemical Societies Congress 2013 «Mechanisms in Biology» (6-11.07.2013, St Petersburg). FEBS Journal 280 (Suppl. 1). 2013. P. 595
17. Kovnir S. V., Orlova N. A., Vorobiev I. I., Shakhparonov M. I., Gabibov A. G. Methods development for high level recombinant factor IX production in mammalian cells cells. // 38th Federation of European Biochemical Societies Congress 2013 «Mechanisms in Biology» (6-11.07.2013, St Petersburg). FEBS Journal 280 (Suppl. 1). 2013. P. 596
20. Ходак Ю.А., Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьев И.И. Клеточные линии высокоэффективных продуцентов фолликулостимулирующего гормона человека, полученные с использованием трицистронного варианта плазмидного вектора p1.1. // XXVI Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» Москва, 10-14 февраля 2014 г. С. 28.
21. Воробьев И.И., Орлова Н.А., Ковнир С.В., Ходак Ю.А., Габибов А.Г., Скрыбин К.Г. Семейство специализированных плазмидных векторов для экспрессии терапевтических белков в клетках млекопитающих. // Материалы VIII Московского Международного Конгресса "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 17-20 марта 2015 г.) ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. 2015. Издательство: ЗАО «Экспо-биохим-технологии». С. 289-290
22. Орлова Н.А., Ковнир С.В., Ходак Ю.А., Воробьев И.И. Создание промышленных линий-продуцентов терапевтических белков. // 19-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 20-24.04.2015 г.) Сборник тезисов. Пушино, 2015. С.34-35
23. Ковнир С.В., Орлова Н.А., Шахпаронов М.И., Воробьев И.И. Продуцент фактора свертывания IX – частное решение на основе платформы p1.1/p1.2. вспомогательные конструкции, удельная продуктивность и активность целевого рекомбинантного белка. // 19-я Международная Пушинская

- школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 20-24.04.2015 г.) Сборник тезисов. Пушино, 2015. С. 23-23
24. И.И. Воробьев, Н.А. Орлова, С.В. Ковнир, Ю.А. Ходак, А.Г. Габибов, К.Г. Скрябин. Плазмидные векторы на основе гена EEF1A китайского хомячка для получения терапевтических белков в культивируемых клетках CHO // Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM. (г. Дагомыс, Сочи, 04-8.10.2016 г.) —Acta Naturae Спецвыпуск Том 2 — 2016. — 254 с. С. 141
25. Кондрашова М.П., Ходак Ю.А., Ковнир С.В., Орлова Н.А., Воробьев И.И. Изучение динамики амплификации генетических конструкций, кодирующих субъединицы лютеинизирующего гормона человека, в геноме клеток-продуцентов при использовании двух амплифицируемых маркеров устойчивости. // Ломоносов – 2016: Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых: секция «Биология»; 11-15.04.2016 г.: Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет. Тезисы докладов. Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2016. – С.20-21
26. Кондрашова М.П., Ходак Ю.А., Ковнир С.В., Орлова Н.А., Воробьев И.И. Изучение динамики амплификации генетических касет в геноме клеток-продуцентов лютеинизирующего гормона при коэкспрессии пар совместимых векторов // Биология – наука XXI века: 20-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 18 - 22.04.2016 г.). Сборник тезисов. Пушино, 2016. - С.226-227
27. Ильин И.С., Орлова Н.А., Ходак Ю.А., Воробьев И.И. Влияние структуры 5'-нетранслируемой области целевого гена и элементов экспрессионного вектора на эффективность экспрессии гена тканевого активатора плазминогена человека в клетках яичника китайского хомячка. // Биология – наука XXI века: 20-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 18 - 22.04.2016 г.). Сборник тезисов. Пушино, 2016. - С.223-224
28. Ильин И.С., Орлова Н.А., Ковнир С.В., Ходак Ю.А., Воробьев И.И. Сравнительное исследование эффективности экспрессии гена тканевого активатора плазминогена человека в клетках линии CHO для векторов с различными селекционными маркерами // XXVIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 8-11 февраля, 2016 г.). Сборник тезисов. Москва, ФГБУН ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 2016.— С. 139
29. Кондрашова М.П., Орлова Н.А., Воробьев И.И. Генетические конструкции для получения рекомбинантного лютеинизирующего гормона человека в клетках яичника китайского хомячка. //XXVIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 8-11 февраля, 2016 г.). Сборник тезисов. Москва, ФГБУН ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 2016.— С. 141
30. И.И. Воробьев, А.С. Семихин, М.А. Ползиков. Биоаналоговый фоллитропин альфа: от разработки до клинических испытаний. // «Репродуктивные технологии сегодня и завтра». Материалы XXVII международной конференции Российской Ассоциации Репродукции Человека (6—9 сентября 2017 г., Санкт-Петербург) — 328 с. С. 105-106
31. Ильин И.С., Орлова Н.А., Воробьев И.И., Ковнир С.В., Ходак Ю.А. Разработка экспрессионных векторов для эффективной экспрессии гена тканевого активатора плазминогена в клетках яичника китайского хомячка. // XXIX Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва 7-10 февраля 2017 г.). Сборник тезисов. Москва, ФГБУН ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 2017.— С. 122
32. Синегубова М.В., Ковнир С.В., Орлова Н.А., Ползиков М.А., Воробьев И.И. Исследование параметров культивации клеточной линии CHO C-P1.3-FSH-G4 - продуцента рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека // «Биология – наука XXI века»: 23-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых (15 - 19.04.2019 г., Пушино). Сборник тезисов, 2019. – 434 с. С. 148
33. Синегубова М.В., Орлова Н.А., Ползиков М.А., Воробьев И.И. Исследование промышленной пригодности процессов выделения и очистки рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона

человека // XXXI Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва 11-14 февраля 2019 г.). Сборник тезисов. Москва, ФГБУН ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 2019.— С. 135

**Патенты:**

1. Воробьев А.И., Мирошников А.И., Габибов А.Г., Воробьев И.И., Пономаренко Н.А., Шамборант О.А., Шустер А.М., Мартьянов В.А. Рекомбинантная плазмидная ДНК, кодирующая последовательность белка фактора VII человека, линия клеток ВНК/F7, трансформированная плазмидной ДНК. Патент РФ № 2337965. Приоритет от 07.08.2006 // Бюл. «Изобретения. Полезные модели», № 31, 2008.
2. Пономаренко Н.А., Шамборант О.Г., Сурина Е.А., Смирнов И.В., Воробьев И.И., Мирошников А.И., Шустер А. М., Мартьянов В.А. Способ очистки рекомбинантного фактора VIIa человека. Патент РФ 2429008 . Приоритет 22.09.2010 // Бюл. "Изобретения. Полезные модели", № 26, 2011
3. Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьев И.И., Юрьев А.С., Воробьев А.И. Экспрессионная генетическая конструкция рOptivec/F8BDD, кодирующая рекомбинантный фактор свертываемости крови VIII человека с делецией В домена и клеточная линия DG OV F8BDD 18, продуцирующая рекомбинантный фактор свертываемости крови VIII человека с делецией В домена. Патент РФ № 2429294. Приоритет от 23.10.2009 // Бюл. «Изобретения. Полезные модели», № 26, 2011.
4. Орлова Н.А., Воробьев И.И., Звягин И.В., Шендер В.О. Нетранскрибируемый плазмидный вектор рVL-T для клонирования сложных геномных последовательностей и многомодульной сборки генно-инженерных конструкций (варианты), и набор, содержащий указанный вектор. Патент РФ № 2507266. Приоритет от 16.11.2011// Бюл. «Изобретения. Полезные модели», № 5, 2014.
5. Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьев И.И. Экспрессионный плазмидный вектор для гетерологичной экспрессии рекомбинантных белков, высокочастотной интеграции и усиленной амплификации экспрессионной кассеты в клетках млекопитающих, бицистронная мРНК, способ получения стабильных линий продуцентов рекомбинантных белков с использованием указанного вектора, способ получения рекомбинантных белков. Патент РФ № 2488633. Приоритет от 16.11.2011 // Бюл. «Изобретения. Полезные модели», № 21, 2013.
6. Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьев И.И., Воробьев А.И. Плазида для экспрессии рекомбинантного фактора свертываемости крови VIII человека с делетированным В-доменом в клетках СНО, клетка СНО - продуцент рекомбинантного фактора свертываемости крови VIII человека с делетированным В-доменом и способ получения указанного фактора. Патент РФ № 2561466. Приоритет от 22.05.2013 // Бюл. «Изобретения. Полезные модели» №24, 2015.
7. Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьев И.И. Экспрессионный плазмидный вектор моноцистронной экспрессии рекомбинантных белков в клетках млекопитающих, линия клеток млекопитающих-продуцентов рекомбинантного белка, способ получения рекомбинантного белка. Патент РФ № 2552170. Приоритет от 14.05.2013 // Бюл. «Изобретения. Полезные модели», № 16, 2015.
8. Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьев И.И. Плазида для экспрессии в клетке китайского хомячка, клетка китайского хомячка - продуцент белка с Gla- доменом и способ получения белка с Gla-доменом. Патент РФ № 2535871. Приоритет от 10.07.2013 // Бюл. «Изобретения. Полезные модели», № 35, 2014.
9. Ковнир С.В., Орлова Н.А., Воробьев И.И., Ходак Ю.А., Дронина М.А., Смирнов И.В., Пономаренко Н.А., Скрябин К.Г., Габибов А.Г. Плазида для экспрессии рекомбинантного фактора свёртываемости крови IX человека, клетка СНО - продуцент рекомбинантного фактора свёртываемости крови IX человека и способ получения указанного фактора. Патент РФ № 2585532. Приоритет от 31.01.2014 // Бюл. «Изобретения. Полезные модели», № 15, 2016.
10. Воробьев И.И., Орлова Н.А., Ковнир С.В., Ходак Ю.А. Плазида для экспрессии в клетках СНО рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) человека, плазида для экспрессии в клетках СНО бета-субъединицы рекомбинантного ФСГ человека, клетка СНО - продуцент рекомбинантного ФСГ человека и способ получения указанного гормона Патент РФ № 2560596. Приоритет от 24.09.2013 // Бюл. «Изобретения. Полезные модели», № 235, 2015.