

## АННОТАЦИЯ

*научно-квалификационной работы Синегубовой Мариш Валерьевны на тему «Би- и трицистронные генетические конструкции на основе гена EEF1A1 китайского хомячка для получения продуцентов гонадотропных гормонов и диагностических реагентов»  
(06.06.01 Биологические науки, 1.5.6 Биотехнология)*

В настоящей работе были рассмотрены различные аспекты получения продуктивных линий-продуцентов фармацевтически значимых гликопротеинов, в частности, двух гормонов семейства гонадотропинов – фолликулостимулирующего гормона человека (ФСГч) и хорионического гонадотропина человека (ХГч), а также рецептор-связывающего домена (RBD) шиповидного (S) белка коронавируса SARS-CoV-2. Для получения продуцентов перечисленных белков была использована проприетарная векторная плазмида p1.1 на основе гена фактора элонгации китайского хомячка EEF1A1, содержащая промотор, терминатор и протяжённые некодирующие участки данного гена. Для ФСГч, продуцент которого был получен ранее в лаборатории, в рамках настоящей работы был разработан процесс очистки из культуральной жидкости, получаемой при культивировании линии C-P1.3-FSH-G4, и успешно внедрен в промышленное производство.

Для векторной плазмиды p1.1 на основе гена EEF1A1 китайского хомячка было показано, что ее размер может быть значительно уменьшен с сохранением свойства стабильности экспрессии целевого белка. Компактный вариант плазмиды (p1.1-Tr2) был использован для получения продуцентов двух фармацевтически значимых гликопротеинов различных классов в стабильно трансфицированной культуре клеток CHO. Экспрессионные плазмиды кодировали субъединицу/-ы целевых белков и во всех случаях селекционный маркер дигидрофолатредуктазу; соответственно, была использована бицистронная схема генетической кассеты для односубъединичных белков и трицистронная – для двухсубъединичных белков. Так, был получен поликлональный продуцент RBD S-белка коронавируса SARS-CoV-2, разработанный процесс синтеза и одноэтапной хроматографической очистки белка обеспечил конечный выход 30 мг/л, очищенный продукт специфично реагировал с анти-SARS-CoV-2 антителами в иммунологических тестах, таких как ИФА и ТСХ. Кроме того, был получен клональный продуцент гетеродимерного белка семейства гонадотропных гормонов – ХГч, состоящего из двух цепей. Найденный способ балансировки синтеза и секреции отдельных цепей – дополнительная трансфекция конструкцией, кодирующей недостающую цепь – позволил получить линию, секретирующую преимущественно гетеродимерную, биологически активную форму гормона с высоким выходом (120 мг/л в fed-batch процессе). Постоянство уровня экспрессии целевого белка для продуцентов, полученных с использованием укороченной плазмиды p1.1-Tr2, была продемонстрирована на примере продуцента ХГч: уровень секреции гормона оставался неизменным при пассировании в течение 90 дней в неселективных условиях.