

На правах рукописи

Синегубова Мария Валерьевна

**ПОЛУЧЕНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ
ГЛИКОПРОТЕИНОВ В КЛЕТКАХ ЯИЧНИКА
КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА**

1.5.4. Биохимия

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва
2026

Работа выполнена в лаборатории биоинженерии клеток млекопитающих Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Научный руководитель: **Воробьев Иван Иванович**
доктор биологических наук, заведующий лабораторией биоинженерии клеток млекопитающих ФИЦ Биотехнологии РАН

Официальные оппоненты: **Иванов Александр Владимирович**
доктор биологических наук, заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук» (ИМБ РАН)

Фирстова Виктория Валерьевна
доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ПМБ)

Ведущая организация: ФГБУН «Институт биологии гена Российской академии наук» (ИБГ РАН)

Защита состоится 18 июня 2026 года в 14-00 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.233.01 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, дом 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 1 и на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан « » _____ 2026 года

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Разработка высокопродуктивных линий клеток млекопитающих, секретирующих фармацевтически значимые белки, является одной из ключевых задач современной биофармацевтики и требует применения современных научно-технических решений, основанных на методах биохимии, молекулярной биологии и клеточной инженерии. Данная диссертационная работа посвящена созданию линий-продуцентов фармацевтически значимых гликопротеинов на основе культивируемых клеток яичника китайского хомячка (Chinese Hamster Ovary, CHO). В работе рассмотрены ключевые аспекты получения таких гликопротеинов — от дизайна генетических конструкций, кодирующих целевой белок, и получения стабильных клональных линий до разработки и валидации методик выделения целевых рекомбинантных белков, контроля их качества и переноса разработок на промышленное производство. Созданные в ходе исследования генетические конструкции легли в основу разработки технологий получения медицинских препаратов рекомбинантных гликопротеиновых гормонов для терапии бесплодия у человека и реагентов для диагностических тест-систем.

Особую актуальность работа приобрела в контексте пандемии COVID-19. Быстрое распространение нового коронавируса SARS-CoV-2 и тяжесть вызываемого им заболевания создали беспрецедентную потребность в массовом диагностическом тестировании. Ключевым компонентом таких тестов является рецептор-связывающий домен (RBD) шиповидного (S) белка SARS-CoV-2 — иммунодоминантный антиген, использующийся для серологической диагностики. При стандартном расходе антигена для изготовления микропланшетов для одного миллиона тестов требуется около 250 мг очищенного белка RBD. Такое количество белка в виде однородной партии невозможно получить с помощью транзientной трансфекции клеток CHO или клеток эмбриональной почки человека HEK293. Таким образом, получение высокопродуктивной стабильно трансфицированной клеточной линии CHO, секретирующей белок RBD с постоянными характеристиками от партии к партии, являлось критически важной задачей для обеспечения работы производителей диагностических тестов.

Важным прикладным аспектом использования рекомбинантного RBD стала разработка безопасного и высокопроизводительного биохимического теста суррогатной вирус-нейтрализации (сВНТ). Традиционный метод оценки вирус-нейтрализующих антител (ВНА) с использованием живого вируса требует работы в лаборатории повышенного уровня биобезопасности (BSL-3), он трудоемок и не подходит для массового скрининга. Актуальной задачей являлась разработка теста, напрямую измеряющего функциональную активность антител — их способность блокировать

ключевое взаимодействие вируса с клеткой. Такой тест, основанный на иммуноферментном анализе, позволил бы быстро и безопасно оценивать гуморальный иммунитет у переболевших и вакцинированных в клинической и эпидемиологической практике.

Другой важной областью применения разработанных технологий является производство рекомбинантных гликопротеиновых гормонов человека. Семейство этих гормонов у человека включает в себя три гипофизарных гормона — тиреотропный гормон (ТТГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ), а также плацентарный гормон хорионический гонадотропин (ХГ). В медицине ФСГ, ЛГ и ХГ используются во вспомогательных репродуктивных технологиях (ВРТ) для лечения бесплодия у человека, а ТТГ — преимущественно в диагностике рака щитовидной железы. Все четыре гормона представляют собой нековалентно связанные гетеродимеры, состоящие из общей для семейства α - и уникальной β -субъединицы, и проявляют физиологическую активность только как $\alpha\beta$ -гетеродимер. Гетеродимерная структура и обильное гликозилирование (около 30 % углеводов по массе) делает эти белки крайне сложными для экспрессии в культуре клеток и требует разработки инновационных подходов для повышения титра биологически активной формы продуктов. Для создания конкурентоспособных биоаналогичных лекарственных препаратов этих гормонов необходимо не только получить стабильно продуцирующую линию с высоким титром, но и обеспечить максимальное сходство биохимических свойств молекул действующего вещества в составе биоаналогичной и оригинальной разработки.

Одним из лимитирующих этапов биосинтеза секретируемых белков является транслокация транслируемого полипептида в эндоплазматический ретикулум, эффективность которой может быть заметно повышена заменой нативного сигнального пептида (СП) на гетерологичный. Для гликопротеиновых гормонов на момент проведения настоящей работы подобные исследования не проводились. Оптимизация СП рассматривалась как ключевой шаг для увеличения выхода целевого продукта на ранних стадиях его биосинтеза. Было предположено, что оптимизация СП для β -субъединиц гликопротеиновых гормонов может значительно усилить секрецию целевых гетеродимеров в культуре СНО.

Для биофармацевтической разработки также крайне актуальным является оптимизация дорогостоящих процессов очистки целевых белков. Так, для выделения ФСГ из кондиционированной культуральной среды линии P1.3-FSH-G4, ранее полученной в лаборатории биоинженерии клеток млекопитающих ФИЦ Биотехнологии РАН, был разработан многостадийный процесс очистки на основе иммуноаффинной хроматографии с высокоспецифичными однодоменными антителами. Хотя пригодность данного метода в лабораторном масштабе была подтверждена, отсутствовали данные о стабильности

сорбентов для использования в промышленном масштабе, практической динамической ёмкости связывания (dynamic binding capacity, DBC) и динамике утечки лиганда в повторяющихся циклах эксплуатации. Поскольку масштабирование данного технологического процесса требует значительных материальных затрат, оптимизация и валидация процесса на лабораторных уменьшенных моделях являлись крайне необходимыми перед внедрением в серийное промышленное производство.

Цель и задачи

Основной целью настоящей работы было получение фармацевтически значимых гликопротеинов в клетках яичника китайского хомячка. Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Установить роль некодирующих участков гена *EEF1A1* китайского хомячка и фрагмента конкатемера длинного концевой повтора вируса Эпштейна-Барр в составе плазмиды p1.1.
2. Провести биохимическую и структурную оптимизацию рецептор-связывающего домена (RBD) шиповидного белка коронавируса SARS-CoV-2, получить его эффективный продуцент.
3. Разработать тест суррогатной вирус-нейтрализации (сВНТ), основанный на конкурентном иммуоферментном анализе, для определения уровня нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в сыворотке переболевших COVID-19.
4. Исследовать влияние гетерологичных сигнальных пептидов на секрецию β -цепей гликопротеиновых гормонов в клетках CHO.
5. Получить сбалансированный промышленный продуцент хорионического гонадотропина человека с максимальным содержанием биологически активного гетеродимера и оптимальными биохимическими свойствами гормона.
6. Оценить промышленную пригодность процессов очистки рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека, секретируемого клеточной линией C-R1.3-FSH-G4.

Научная новизна

Научная новизна исследования заключается в решении комплекса фундаментальных и прикладных задач, направленных на создание рекомбинантных терапевтических и диагностических белков.

В части оптимизации векторных систем впервые на примере модельного зеленого флуоресцентного белка (enhanced green fluorescent protein, eGFP) было установлено, что некодирующие участки гена фактора элонгации трансляции китайского хомячка (*eukaryotic translation elongation factor 1a*, *EEF1A1*), фланкирующие целевой ген в экспрессионной плазмиде p1.1, могут быть удалены из плазмиды без существенной

потери стабильности уровня экспрессии целевого белка при длительной культивации в неселективных условиях. На примере стандартной плазмиды pOptiVEC, содержащей промотор цитомегаловируса (CMV), также была установлена роль участка фрагмента конкатемера длинных концевых повторов вируса Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus terminal repeat, EBVTR), заключающаяся в поддержании постоянства уровня экспрессии целевого гена при стабильной трансфекции в клетки млекопитающих. Плазмиды на основе EEF1A1-промотора показали себя более стабильными, чем плазмиды на основе CMV-промотора. Минимальный функциональный вариант p1.1-Tr2 был успешно применен для создания линий-продуцентов фармацевтически значимых белков, таких как RBD S-белка SARS-CoV-2 и ХГч.

Важным достижением стала разработка рекомбинантного мономерного RBD S-белка SARS-CoV-2, лишённого непарного остатка цистеина. Эта модификация устранила склонность RBD к формированию ковалентных гомодимеров и обеспечила высокую иммуноспецифичность. Полученный RBD был использован в тесте суррогатной вируснейтрализации (сВНТ) на основе ИФА для оценки титра нейтрализующих антител у переболевших COVID-19 или вакцинированных. При этом было показано, что оптимальная чувствительность теста достигается при использовании нативного RBD в качестве иммобилизованного антигена и конъюгата растворимого ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ2) с пероксидазой хрена (horseradish peroxidase, HRP) в качестве детектирующего реагента. Предложенный метод сВНТ является простой и безопасной альтернативой трудоёмкой реакции классической ВНТ с использованием живого вируса.

Впервые для всех четырех представителей семейства гликопротеиновых гормонов (ФСГ, ЛГ, ХГ, ТТГ) проведено систематическое исследование влияния гетерологичного СП на секрецию их β -цепей. Установлено, что СП человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) является наиболее универсальным, обеспечивающим статистически значимое увеличение продуктивности по гетеродимерной форме для ХГ (в 1,5 раза), ЛГ (в 4 раза) и ТТГ (в 13 раз).

При получении высокопроизводительных линий-продуцентов ХГч был разработан оригинальный подход, включающий анализ соотношения экспрессии α - и β -субъединиц в стабильно трансфицированных популяциях и последующую трансфекцию конструкцией, несущей ген дефицитной цепи и второй метаболический селекционный маркер. Подход позволил сбалансировать уровень экспрессии цепей, увеличить общий выход гетеродимера более чем в 2 раза, и перейти к культивированию клеток без внесения глутамина. Клональная линия-продуцент ХГч S-pTr2-hCG-8 достигала титра более 100 мг/л и сохраняла продуктивность в течение 60 генераций, что делает ее пригодной для промышленного применения. Анализ основных физико-химических свойств полученного

ХГч показал их соответствие свойствам ХГч, содержащегося в составе оригинального препарата. Профиль гликозилирования (Z-индекс) полученного биоаналогичного ХГч, отражающий уровень терминального сиалирования N-гликанов и влияющего на биологическую активность ХГч, не отличался от Z-индекса оригинального ХГч.

Впервые проведена комплексная оценка промышленной пригодности многостадийного процесса очистки рекомбинантного ФСГ человека (рФСГч), секретируемого линией C-P1.3-FSH-G4, из культуральной жидкости до фармацевтических показателей качества продукта. Доказано сохранение свойств всех используемых в технологическом процессе хроматографических сорбентов в течение 40 хроматографических циклов, включающих процедуры очистки и санитарной обработки сорбента. Впервые подробно зафиксирована динамика сохранения емкости для аффинного хроматографического сорбента ключевой стадии очистки (CaptureSelect™FSH Affinity) и детально изучена динамика смыва однодоменных камелидных мини-антител, способных контаминировать конечный целевой продукт и продемонстрировано их полное удаление из раствора ФСГ при следующих стадиях очистки.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы заключается в расширении фундаментальных знаний о механизмах регуляции экспрессии генов в клетках млекопитающих, роли СП в эффективной секреции сложных гетеродимерных белков и факторах, обеспечивающих стабильность плазмидных векторов и продуктивности клеточных линий при длительном культивировании. Разработанные принципы балансировки экспрессии субъединиц гетеродимеров и использования комбинаций регуляторных элементов (промотор *EEF1A1*, элемент EBVTR) имеют универсальный характер и применимы для конструирования продуцентов других фармацевтически значимых белков. Разработанные платформенные решения на основе бицистронных (для односубъединичных белков) и трицистронных (для двухсубъединичных белков) конструкций с промотором *EEF1A1* могут быть использованы для дальнейшей разработки продуцентов других фармацевтически значимых гликопротеинов.

Практическая значимость исследования подтверждена внедрением его результатов. Разработана линия-продуцент RBD S-белка коронавируса SARS-CoV-2 с высокой продуктивностью, получаемый продукт обладает высокой антигенной специфичностью и был использован для производства иммунодиагностических тестов для определения антител к SARS-CoV-2 методом тонкослойной хроматографии, а также в тестах сВНТ.

Разработанная линия-продуцент ХГч является источником фармацевтически значимого белка, применяемого в качестве лекарственного средства для лечения бесплодия у человека в программах ВРТ. Титр ХГч, секретируемого полученной линией в оптимизированных условиях культивирования, является экономически выгодным для

внедрения в промышленное производство, при этом полученный гормон обладает физико-химическими свойствами и биологической активностью, позволяющими сделать вывод о его биоаналогичности ХГч, входящему в состав оригинального лекарственного препарата.

Результаты оптимизации и валидации процессов очистки рФСГч были перенесены в промышленное производство и внесли значительный вклад в успешное масштабирование технологического процесса получения гормона от лабораторного до промышленного масштаба. Немаловажным доказательством достоверности и практической полезности исследования является тот факт, что, начиная с 2020 года до настоящего момента, получено более 60 промышленных партий лекарственного препарата на основе разработанного процесса очистки рФСГч с воспроизводимыми биохимическими свойствами молекулы от партии к партии.

Степень достоверности результатов

Эксперименты проводились независимо друг от друга, с использованием положительных и отрицательных контролей. Исследование подтверждено воспроизводимостью значений измерений. Полученные данные проанализированы с использованием современных методов статистической обработки.

Публикации и апробация результатов

По теме диссертации были опубликованы 6 статей в журналах, индексируемых в Scopus/Web of Science, получен 1 патент на изобретение. Результаты работы были представлены на нескольких научных конференциях: XXXI, XXXIII, XXXIV, XXXVI Зимней молодёжной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (2019, 2021, 2022, 2024 гг.), 23-й и 24-ой Международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (2019, 2021, 2022 гг.), IV Студенческом биохимическом форуме (2024 г.), втором и третьем Саммите разработчиков лекарственных препаратов «Сириус. Биотех» (2024, 2025 гг.), XXXIV международной конференции РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» (2024 г.), XVI и XVIII международной конференции мКАРМ «Краеугольные аспекты репродуктивной медицины» (2023, 2024 гг.), международной научной конференции РУДН Science4Health (2025 г.), XVIII Курчатовской молодёжной научной школе (2025 г.).

Личный вклад автора

Экспериментальные данные, представленные в настоящей работе, получены лично автором либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование, выполнение экспериментов, обработку данных, а также оформление и публикацию результатов. Автор лично проводил асептическое культивирование клеток

млекопитающих в процессе получения линий-продуцентов и осуществлял аналитические методики, описанные в данной работе. Автор выражает признательность всем коллегам за совместную работу. Молекулярное клонирование проводилось совместно с к.б.н. Орловой Н.А. Постановка теста суррогатной вирус-нейтрализации (сВНТ), а также эксперименты по исследованию влияния сигнальных пептидов на титр гликопротеиновых гормонов проводились совместно с Колесовым Д.Э. Исследования стабильности свойств хроматографических сорбентов, используемых в процессе получения рекомбинантного фолликулолестимулирующего гормона (рФСГч), и поиск оптимальных условий выделения из культуральной среды рецептор-связывающего домена (RBD) SARS-CoV-2 проводились совместно с д.б.н. Воробьевым И.И. Разработка методов очистки и контроля качества хорионического гонадотропина человека (ХГч) проводилась совместно с сотрудниками ООО «Фармапарк» Клишиным А.А., Зыряновым Д.А. Результаты контроля качества промышленных партий рФСГч получены отделом контроля качества площадкой-производителя ООО «Завод Медсинтез» (г. Новоуральск, Россия), автор совместно с сотрудниками ООО «АйВиФарма» принимал непосредственное участие в разработке, промышленном трансфере процесса культивирования в биореакторе, а также разработке, валидации и трансфере ряда методик контроля качества рФСГч и ХГч.

Методология и методы исследования

В работе использован широкий спектр биохимических, молекулярно-биологических, микробиологических и клеточных методов: методы работы с ДНК (рестрикция, лигирование, препаративное выделение из бактериальных культур и пересаживание, электрофорез в агарозном геле); методы работы с бактериальными культурами (получение компетентных клеток, трансформация, отбор целевых колоний, создание бактериальных музеев); методы работы с культурами клеток млекопитающих (асептическое пассирование, микроскопия, трансфекция, клеточное клонирование); методы очистки белков (колоночная хроматография, фильтрация); аналитические методы (ПЦР в реальном времени, электрофорез белков в полиакриламидном геле, колоночная хроматография, иммуноферментный анализ, вестерн-блоттинг, изоэлектрофокусирование, количественное определение белка по Брэдфорду, флуориметрия, проточная цитометрия, аналитическая хроматография).

Положения, выносимые на защиту

1. Долгосрочная стабильность экспрессии трансгена в векторной системе на основе плазмиды p1.1-Tr2 достигается за счёт синергичного действия только двух элементов: компактной регуляторной области гена EEF1A1, лежащей выше по течению от промотора, и фрагмента EBVTR.

2. Высокий уровень биосинтеза и антигенная специфичность рекомбинантного RBD-домена S-белка SARS-CoV-2 обеспечиваются структурной оптимизацией, предотвращающей образование некорректных межмолекулярных дисульфидных связей, что является необходимым биохимическим условием для высокоаффинного связывания с рецептором АПФ2 и нейтрализующими антителами.
3. Принцип разработанного теста сВНТ основан на количественной оценке способности нейтрализующих антител стерически блокировать высокоаффинное взаимодействие между иммобилизованным RBD и растворимой формой его клеточного рецептора АПФ2, что делает метод прямым биохимическим коррелятом вирус-нейтрализующей активности, пригодным для широкого скрининга в клиническом применении без использования живого вируса.
4. Наблюдаемое в работе повышение эффективности секреции гликопротеиновых гормонов при использовании гетерологичного сигнального пептида человеческого сывороточного альбумина обусловлено улучшением эффективности транслокации и ко-трансляционной укладки их β -субъединиц в эндоплазматическом ретикулуме, что является ключевым лимитирующим этапом в биосинтезе этих сложных белков.
5. Получение сбалансированного продуцента биоаналогичного хорионического гонадотропина человека требует не только эквимолярной экспрессии субъединиц гормона, но и выбора родительской линии клеток, обеспечивающей корректный биохимический профиль молекулы, соответствующий оригинальному препарату.
6. Промышленная пригодность процесса очистки рФСГч доказывается высокой селективностью и стабильностью работы всех используемых в технологическом процессе хроматографических сорбентов. Оптимизированный процесс обеспечивает воспроизводимое от партии к партии получение фармацевтической субстанции с сохранением биохимических свойств гормона.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов работы и их обсуждения, заключения, практического использования результатов, выводов, списка научных трудов по теме диссертации и списка литературы. Работа изложена на 180 страницах и содержит 366 цитируемых источников, 39 рисунков, 14 таблиц, 1 приложение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация экспрессионного вектора семейства p1.1 на основе гена фактора элонгации трансляции *EEF1A1* китайского хомячка

Проприетарная плаزمиды семейства p1.1 (Рисунок 1А) содержит промотор гена фактора элонгации трансляции 1 альфа (*EEF1A1*) китайского хомячка, протяженные области некодирующих последовательностей ДНК, фланкирующие данный ген, ген дигидрофолатредуктазы (*DHFR*), обеспечивающий метотрексат (MTX)-опосредованную селекцию, внутренний сайт связывания рибосом (IRES) для реинициации трансляции и фрагмент конкатемера длинного концевой повтора вируса Эпштейна-Барр (EBVTR).

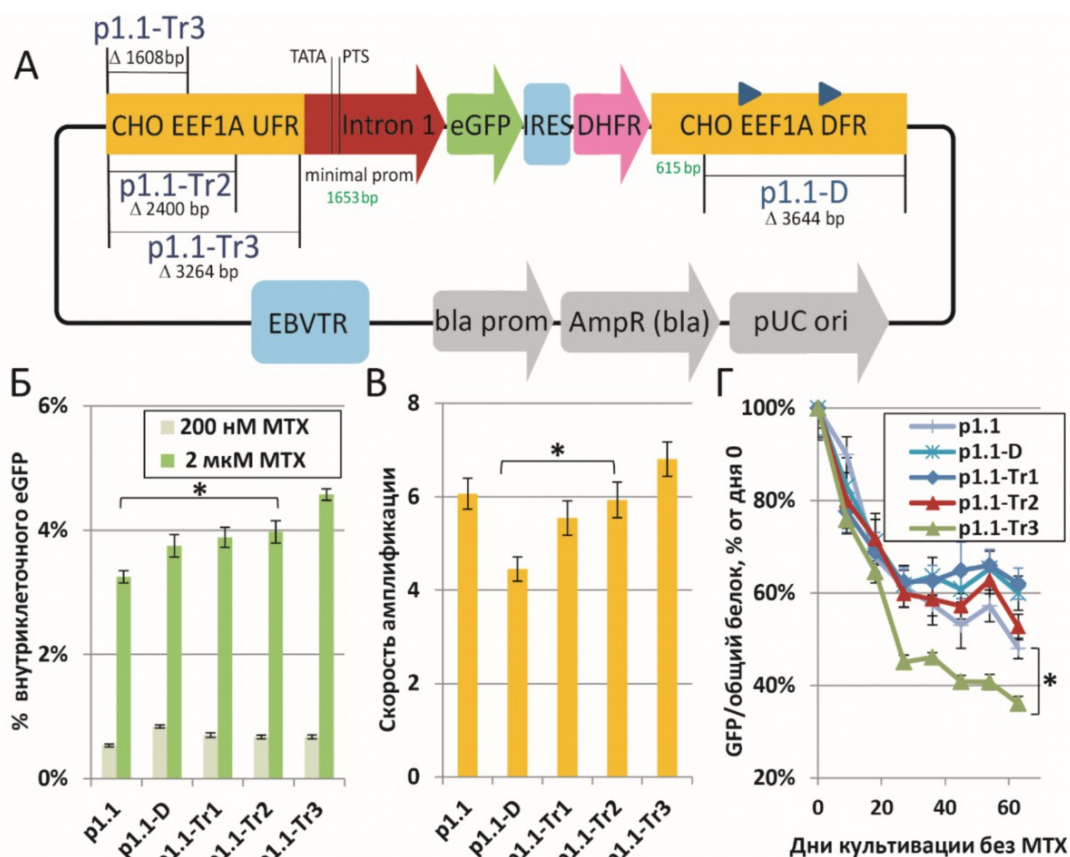


Рисунок 1. Изучение эффектов делеций в вышележащих и нижележащих фланкирующих областях гена фактора элонгации китайского хомячка *EEF1A1* CHO в плазмиде p1.1.

А. Схема полноразмерной плазмиды p1.1 и ее укороченных производных. Показаны делеции в нижележащей фланкирующей области (DFR, Δ3644 п.н.) и серия делеций в вышележащей области (UFR, Δ1608, Δ2400, Δ3264 п.н.). CHO EEF1A UFR/DFR – фланкирующие области гена *EEF1A1* китайского хомячка, содержащие промотор, первый интрон, терминатор и сигнал полиаденилирования; IRES – внутренний сайт связывания рибосом вируса энцефаломиокардита; DHFR – ОРС гена дигидрофолатредуктазы мыши; pUC ori – ориджин репликации; AmpR и bla prom – ген устойчивости к ампициллину и соответствующий промотор; EBVTR – фрагмент конкатемера длинного терминального повтора вируса Эпштейна-Барр.

Б. Уровень внутриклеточного eGFP, нормализованный на уровень общего белка, %.

В. Скорость амплификации при увеличении концентрации MTX от 200 нМ до 2 мкМ.

Г. Снижение уровня экспрессии eGFP при длительном культивировании без MTX. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение, n=2-3 (* p<0,05, непарный критерий Стьюдента).

Было предположено, что удаление дистальных сегментов некодирующих областей гена *EEF1A*, составляющих до 50 % размера плазмиды, улучшит эффективность амплификации без ущерба для силы промотора или долгосрочной стабильности экспрессии целевого гена. Для проверки гипотезы были созданы четыре варианта плазмиды с делециями (Рисунок 1А), находящимися выше (p1.1-Tr1, p1.1-Tr2, p1.1-Tr3) и ниже по течению (p1.1-D) от целевого гена. После электротрансфекции в клетки СНО DG44, первичной селекции в присутствии 200 нМ МТХ и одного шага амплификации (2 мкМ МТХ) самый высокий уровень экспрессии репортерного белка eGFP был зафиксирован в случае самой компактной плазмиды p1.1-Tr3 (4,57±0,9 % от внутриклеточного белка; Рисунок 1Б), для нее же наблюдали максимальную скорость амплификации (Рисунок 1В). Однако при 64-дневном культивировании без селекционного давления p1.1-Tr3 продемонстрировала статистически значимое снижение экспрессии по сравнению с p1.1-Tr2 и полноразмерным контролем (Рисунок 1Г), что коррелировало с падением копийности трансгена.

Для определения роли фрагмента EBVTR в плазмиде p1.1 данный фрагмент клонировали в стандартную плазмиду pOptiVEC на основе CMV-промотора (pOV(+)-EBV) и сравнили с плазмидой pOptiVEC, не содержащей данный фрагмент (pOV), а также с плазмидой p1.1-Tr2, в которой EBVTR присутствует. Несмотря на более высокую начальную экспрессию модельного белка eGFP в pOV (Рисунок 2А) и максимально быструю амплификацию (Рисунок 2Б), на 68-й день в неселективных условиях pOV сохраняла лишь 20 % от исходной экспрессии, тогда как p1.1-Tr2 — 50 % (Рисунок 2В). Данные ПЦР-РВ подтвердили связь снижения экспрессии с потерей копий трансгена.

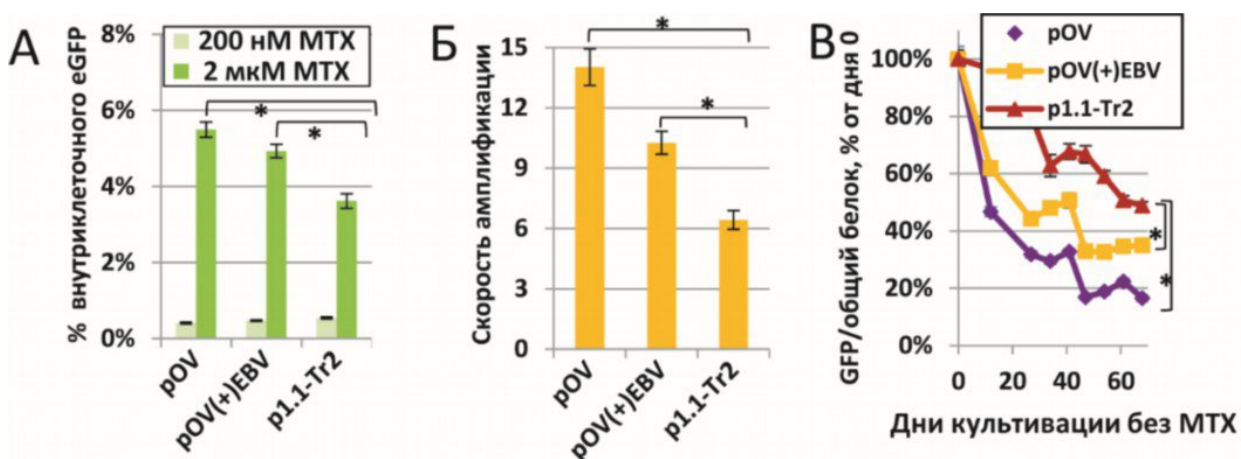


Рисунок 2. Изучение эффектов конкатемера длинного концевого повтора вируса Эпштейна-Барр (EBVTR) в стандартных плаزمидях pOptiVEC с промотором CMV. pOV – pOptiVEC; pOV(+)-EBV – pOptiVEC со вставкой EBVTR; p1.1-Tr2 – укороченный вариант плазмиды p1.1.
А. Уровень внутриклеточного eGFP, нормализованный на уровень общего белка, %.
Б. Скорость амплификации при увеличении концентрации МТХ от 200 нМ до 2 мкМ.
В. Снижение уровня экспрессии eGFP при длительном культивировании без МТХ.

Плазмиду p1.1-Tr2, обеспечивающую стабильную долгосрочную экспрессию за счет компактной вышележащей регуляторной области гена EEF1A1 и фрагмента EBVTR, использовали в последующей работе для получения продуцентов фармацевтически значимых белков для нужд терапии и диагностики.

Получение рецептор-связывающего домена (RBD) шиповидного (S)-белка коронавируса SARS-CoV-2

Были получены продуценты двух вариантов RBD S-белка SARS-CoV-2.

Первый вариант RBDv1 (остатки 319–541 S-белка YP_009724390.1) содержал нативный N-концевой СП S-белка SARS-CoV-2, С-концевые эпитоп с-мус, гексагистидиновый тэг (Рисунок 3А). Титр белка в стабильно трансфицированной культуре CHO DG44 после селекции (200 нМ МТХ) и одностадийной амплификации (2 мкМ МТХ) достигал 3–4 мг/л. При очистке методом Ni-IDA-хроматографии 31 % белка образовывал ковалентные димеры ввиду наличия непарного остатка Cys538 (Рисунок 3Г).

Второй вариант белка RBDv2 (остатки 320–537) содержал ряд изменений: СП тканевого активатора пламиногена человека, измененный линкер, декагистидиновый тэг (Рисунок 3Б). Удаление С-концевого фрагмента C₅₃₈VNF₅₄₁ позволило исключить непарный Cys538, вместе с этим с N-конца зрелого белка RBD был исключен Lys₃₁₉ для максимизации процессинга СП. Эпитоп с-мус располагался между остатком Pro и короткой линкерной последовательностью. Было предположено, что такая структура будет способствовать правильному экспонированию с-мус эпитопа на поверхности белка.

Данные усовершенствования структуры полипептида для варианта RBDv2 позволили повысить титр до 24,6 мг/л для трехдневной культуры (Рисунок 3Д) и до 50 мг/л для 8-дневной культуры, снизить долю димеров до 6 % (Рисунок 3Г). Количественный анализ ПЦР-РВ показал, что увеличенная продуктивность популяций, адаптированных к более высоким концентрациям МТХ, соответствует большему числу копий целевого гена. В то же время более высокая продуктивность клеток для RBDv2 достигалась не за счет увеличения числа копий гена по сравнению с RBDv1, а, по-видимому, за счет изменения структуры белка RBD. Выход при хроматографической очистке RBDv2 на сорбенте Ni-NTA составил 64 % (32 мг/л) (Рисунок 3В). Эксклюзионная хроматография подтвердила преобладание мономерной формы RBD (32,4 кДа, Рисунок 3Е).

Оба варианта RBD показали высокую антигенную специфичность в ИФА с сыворотками пациентов с подтвержденным по ПЦР диагнозом COVID-19 (Рисунок 3Ж), что сделало возможным использование клеточной линии-продуцента RBDv2 в качестве стабильного источника рекомбинантного антигена RBD для производства диагностических тестов для выявления антител к коронавирусу SARS-CoV-2.

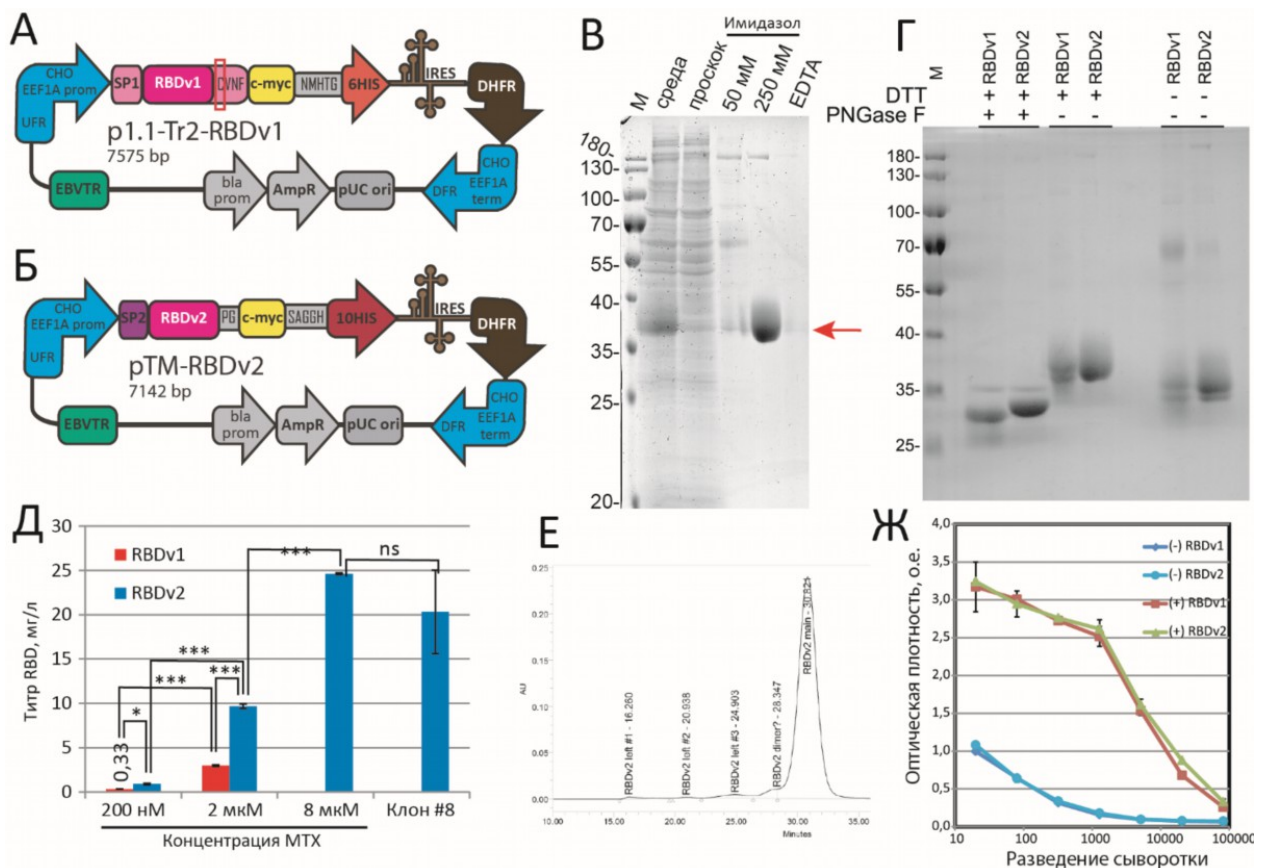


Рисунок 3. Получение рецептор-связывающего домена (RBD) S-белка SARS-CoV-2.

А. Схема экспрессионной плазмиды p1.1-Tr2-RBDv1. Обозначения аналогичны Рис. 1, SP1 – нативный сигнальный пептид; RBDv1 – OPC RBD 319–541; c-мус и HIS – С-концевые тэги; NMHTG – линкерная последовательность.

Б. Схема экспрессионной плазмиды pTM-RBDv2. SP2 – сигнальный пептид тканевого активатора плазминогена человека; RBDv2 – OPC RBD 320–537; PG, SAGGH – линкерные последовательности.

В. Электрофорез в полиакриламидном геле фракций элюатов очистки RBDv2 методом металлохелатной хроматографии (Ni-NTA).

Г. Электрофорез в полиакриламидном геле очищенных белков RBDv1 и RBDv2 в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, а также после обработки PNGase F.

Д. Концентрация RBD в супернатанте клеток трехдневной культуры (ИФА).

Е. Эксклюзионная хроматография для очищенного белка RBDv2.

Ж. Иммунореактивность RBDv1 и RBDv2 по данным ИФА. (+) – пулированные образцы сывороток, полученные от инфицированных SARS-CoV-2 по данным ПЦР-диагностики, (-) – получены от доноров ранее декабря 2019.

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, $n=2$.

Разработка теста суррогатной вирус-нейтрализации, основанного на блокировании антителами взаимодействия АПФ 2 и RBD SARS-CoV-2

К важным иммунологическим характеристикам переболевших COVID-19, а также вакцинированных против SARS-CoV-2 относятся параметры гуморального ответа. Наиболее точным показателем эффективной иммунной защиты от симптомного течения инфекции SARS-CoV-2 считается титр вирус-нейтрализующих антител (ВНА). Стандартный метод обнаружения ВНА к SARS-CoV-2 — тест на нейтрализацию живого вируса — можно заменить биохимическим тестом суррогатной вирус-нейтрализации

(сВНТ) на основе ИФА, измеряющим способность сывороточных антител ингибировать образование комплекса между RBD и его рецептором — ангиотензин-превращающим ферментом 2 типа (АПФ2).

Сравнительный анализ вариантов постановки ИФА показал, что эффективность сВНТ значительно возрастает при использовании в качестве иммобилизованного на планшете антигена интактного RBD, а в качестве детектирующего реагента — конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) растворимого АПФ2. Такой дизайн эксперимента (Рисунок 4А) исключает этап предварительной инкубации в отдельных пробирках и позволяет проводить прямую количественную оценку результатов с использованием линейной регрессии, используя только 3–4 разведения сыворотки пациента. Результаты сВНТ-анализа 73 образцов плазмы реконвалесцентов продемонстрировали высокую корреляцию с результатами анализа классического ВНТ, коэффициент корреляции Спирмена составил 0,83 (Рисунок 4Б). Разработанный анализ сВНТ прост, безопасен, обладает высокой специфичностью и может применяться для массового скрининга титров ВНА для оценки коллективного иммунитета популяции или эффективности вакцин.

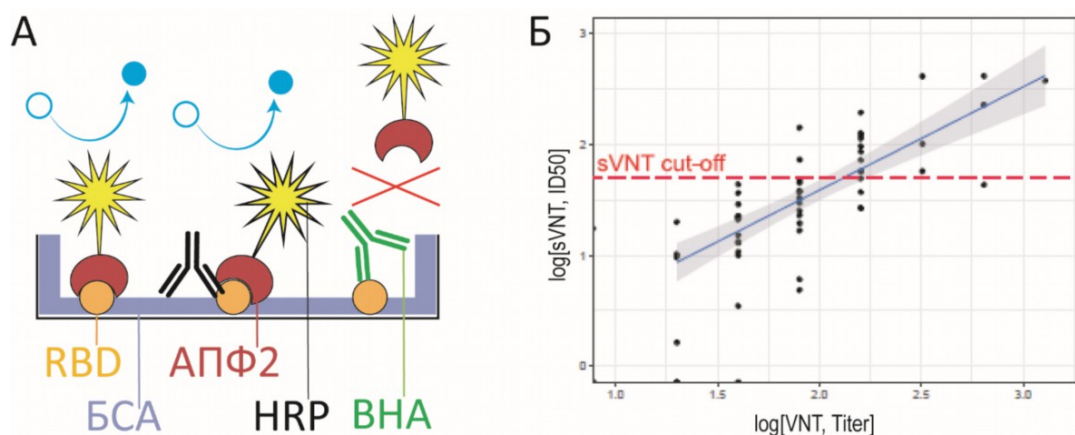


Рисунок 4. Разработка теста суррогатной вирус-нейтрализации (сВНТ) для оценки титра вирус-нейтрализующих антител (ВНА) к SARS-CoV-2.

А. Принцип сВНТ на основе иммуноферментного анализа: ВНА блокируют взаимодействие рецептор-связывающего домена (RBD) S-белка SARS-CoV-2 с конъюгатом ангиотензин-превращающего фермента 2 типа с пероксидазой хрена (АПФ2-HRP).

Б. Корреляция уровней ВНА, определенных при помощи сВНТ и классической ВНТ с использованием живого вируса (коэффициент корреляции Спирмена 0,83).

Увеличение выхода гликопротеиновых гормонов в стабильно трансфицированных клетках СНО с использованием гетерологичного сигнального пептида человеческого сывороточного альбумина для β -цепей

Для β -цепей четырех гликопротеиновых гормонов были исследованы нативные СП их β -цепей (НСП) и гетерологичные для β -цепей СП: человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), человеческого азуроцидина (Азу) и нативный СП общей для всех гликопротеиновых гормонов α -цепи (аСП). Трицистронные конструкции p1.1-Tr2-Gon-

ВИА, основанные на векторной плазмиде минимального размера p1.1-Tr2, кодировали β -субъединицы гормонов с различными СП в первом цистроне, общую α -субъединицу с ее НСП во втором цистроне и селекционный маркер DHFR в третьем цистроне (Рисунок 5А).

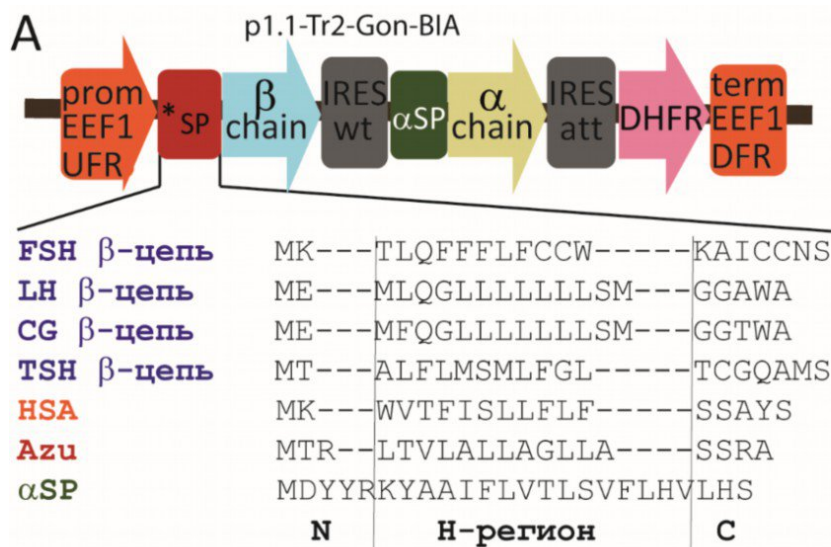
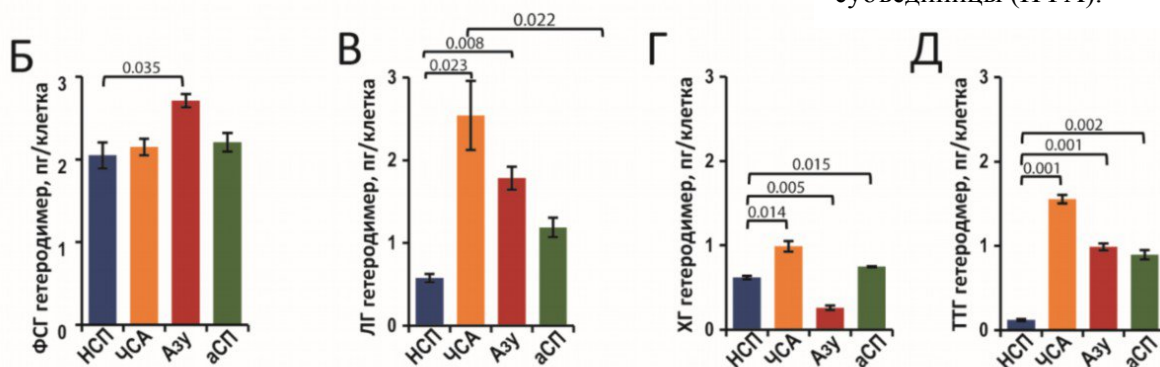


Рисунок 5. Оценка влияния гетерологичных сигнальных пептидов (СП) на секрецию гликопротеиновых гормонов.

А. Генетические конструкции, кодирующие β -субъединицы гликопротеиновых гормонов с варьируемыми СП (*SP) и α -субъединицы с нативным СП (α SP).

Б-Д. Удельная продуктивность по гетеродимеру для клеток-продуцентов гликопротеиновых гормонов при замене СП β -субъединицы (ИФА).



Для четырех гликопротеиновых гормонов, продуцируемых стабильно трансфицированными популяциями клеток СНО, замена НСП β -цепи на гетерологичный СП привела к увеличению продуктивности клеток по гетеродимерному гормону (Рисунок 5Б-Д). Наибольший эффект был достигнут при использовании СП ЧСА: для ЛГ продуктивность составила 2,5 пг на клетку (увеличение в 4 раза), для ТТГ — 1,6 пг/клетка (в 13 раз), для ХГ — 1,0 пг/клетка (на 60%). Для ФСГ наблюдалось увеличение продуктивности на 60% при использовании СП Азу с результатом 2,7 пг/клетка. Данные количественной ПЦР и вестерн-блоттинга показали, что наблюдаемое увеличение продуктивности не было связано с увеличением копийности плазмид, интегрированных в геном, или с общим увеличением уровней биосинтеза обеих цепей. Анализ структуры мРНК также не показал значимых изменений энергий образования вторичной структур (ансамблей шпилек) для использованных вариантов СП.

Наиболее универсальным СП для представителей семейства гликопротеиновых гормонов был признан СП ЧСА, при использовании которого для β -цепи 3-х из 4-х гликопротеиновых гормонов (за исключением ФСГ) возникло статистически значимое увеличение продуктивности клеток.

Получение биоаналогичного хорионического гонадотропина человека (ХГч)

Линии-продуценты ХГч получали на основе двух родительских сублиний CHO: CHO DG44 и CHO S. Клетки CHO DG44 трансфицировали плазмидой p1.1-Tr2-hCG-A1B (кодировала α -субъединицу в первом цистроне, β -субъединицу во втором, DHFR в третьем; Рисунок 6А), клетки CHO S трансфицировали плазмидой p1.1-Tr2-hCG-B1A (кодировала β -субъединицу в первом цистроне, α -субъединицу во втором, DHFR в третьем; Рисунок 6Б).

В результате первичной селекции и последующей геномной амплификации титр гормона повысили в 140 раз в случае CHO DG44 и в 7 раз в случае CHO S. Однако методами ИФА и вестерн-блоттинга была выявлена избыточная экспрессия субъединицы, кодирующейся в первом цистроне каждой конструкции. Для балансировки уровня экспрессии субъединиц и увеличения титра гетеродимерной формы поликлональные популяции были повторно трансфицированы вспомогательными плазмидами, кодирующими дефицитную цепь: β -цепь (p1.2-GS-bhCG, Рисунок 6А) в случае CHO DG44 или α -цепь (p1.2-GS-ahCG, Рисунок 6Б) в случае CHO S. Введение в клетки дополнительных копий гена дефицитной цепи ХГч повысило ее экспрессию, что привело к более чем двухкратному увеличению продуктивности клеток по гетеродимеру в обоих случаях и установлению близкого к эквимолярному баланса цепей.

Полученная клональная линия S-pTr2-hCG-8 продемонстрировал наилучшие ростовые свойства (пиковая плотность клеток 14 млн/мл) и максимальный титр ХГч — $142,9 \pm 10,0$ мг/л на 7-й день культивирования в режиме периодического культивирования с подпиткой. Достаточная стабильная секреция продукта при длительном серийном субкультивировании в течение не менее 60 генераций без селекционного давления делает данную линию пригодной для промышленного применения.

Продукты линий D-pTr2-hCG-55 (на основе CHO DG44) и S-pTr2-hCG-8 (на основе CHO S), выделенные методом иммуноаффинной хроматографии, анализировали методом электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, а также после дегликозилирования при помощи PNGase F (Рисунок 6В). В восстанавливающих условиях β -цепь во всех образцах разделялась на несколько гликоизоформ, видимых как серия полос. В продукте родительских клеток CHO DG44 также наблюдались изоформы α -цепи. Ферментативный гидролиз очищенных вариантов ХГч N-гликозидазой PNGase F привел к исчезновению серий полос для каждой из цепей. Таким образом, три изоформы подвижности β -цепи и два варианта подвижности α -цепи для ХГч из клеток CHO DG44 могут соответствовать только измененным структурам N-гликанов, отделяемых действием PNGase F. При секреции ХГч клетками CHO DG44 образуются гликоформы целевого белка, сильно отличающиеся от гликоформ оригинального препарата ХГч, а при использовании клеток CHO S и практически таких же экспрессионных плазмид видимых

различий гликоформ с оригинальным препаратом не возникает, поэтому для производства биоаналогичного лекарственного препарата ХГч полученная линия клеток S-pTr2-hCG-8 была признана более перспективной.

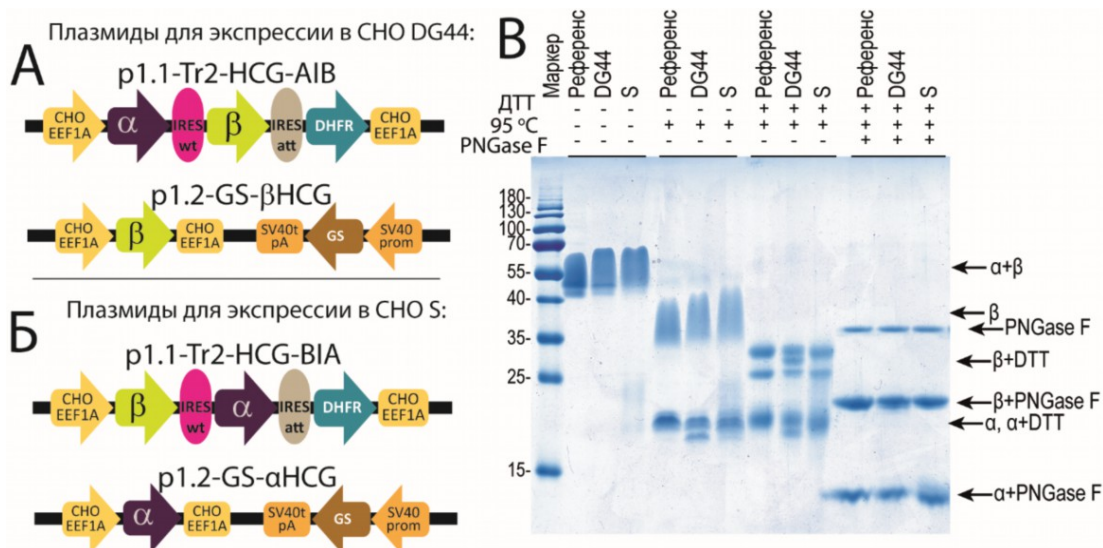


Рисунок 6. Получение сбалансированных продуцентов хорионического гонадотропина человека (ХГч) в двух субклинах CHO (CHO DG44 и CHO S) и анализ продукта после одностадийной очистки на иммуноаффинном сорбенте.

А. Схема плазмид, использованных для трансфекции CHO DG44: основная плазида с селекционным маркером DHFR, кодирующая α - и β -цепи ХГч, и вспомогательная плазида с селекционным маркером GS, кодирующая β -цепь ХГч. Обозначения аналогично Рис. 1А; α/β – ОПС α/β -цепи ХГч; IRESwt/IRESatt – природный/аттенуированный внутренний сайт связывания рибосом EMCV; GS – ОПС глутаминсинтазы мыши; SV40p и SV40t – промотор и терминатор вируса SV40.

Б. Схема плазмид, использованных для трансфекции CHO S: основная плазида с селекционным маркером DHFR, кодирующая β - и α -цепи ХГч, и вспомогательная плазида с селекционным маркером GS, кодирующая α -цепь ХГч. Обозначения аналогичны (Б).

В. Электрофорез в полиакриламидном геле для очищенного иммуноаффинным способом ХГч в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, а также после обработки PNGase F. Референс – оригинальный лекарственный препарат ХГч Овитрель®. Стрелки указывают положение полос (или серий полос) гетеродимера ХГч ($\alpha+\beta$), β -цепи ХГч, α -цепи ХГч.

Для получения продукта фармацевтического качества, соответствующего современным фармакопейным требованиям, был разработан многоэтапный процесс очистки ХГч из культуральной жидкости, включающий аффинную, ионообменную и эксклюзионную хроматографию. Фракции полупродуктов очистки были проанализированы при помощи электрофореза в полиакриламидном геле (Рисунок 7А). Для высокоочищенного гормона, полученного из линии CHO S, масс-спектрометрический анализ триптических пептидов подтвердил полную идентичность первичной аминокислотной последовательности биоаналогичного рХГч как природному гормону, так и оригинальному референтному препарату, с перекрытием 97 % для α -цепи и 100 % для β -цепи. Метод изоэлектрического фокусирования продемонстрировал совпадение профиля кислых гликоизоформ ХГч в биоаналогичном и референтном препаратах. Количественный анализ степени сиалирования N-гликанов (Z-индекс) также показал

высокую степень сходства: разница между средними значениями для трёх серий каждого препарата составила 4 % (Рисунок 7Б,В,Г). Таким образом, комплексный сравнительный анализ биохимических свойств, включающий анализ белковой структуры и профиля гликоизоформ, доказал их сопоставимость в оригинальном препарате и в разработанном биоаналогичном ХГч, что соответствует современным требованиям, предъявляемым к биоаналогам. В комплексе с данными о биохимической структуре сходная биологическая активность оригинального и биоаналогичного препаратов, измеренная *in vivo* на крысах, послужила неотъемлемым критерием подтверждения биоаналогичности.

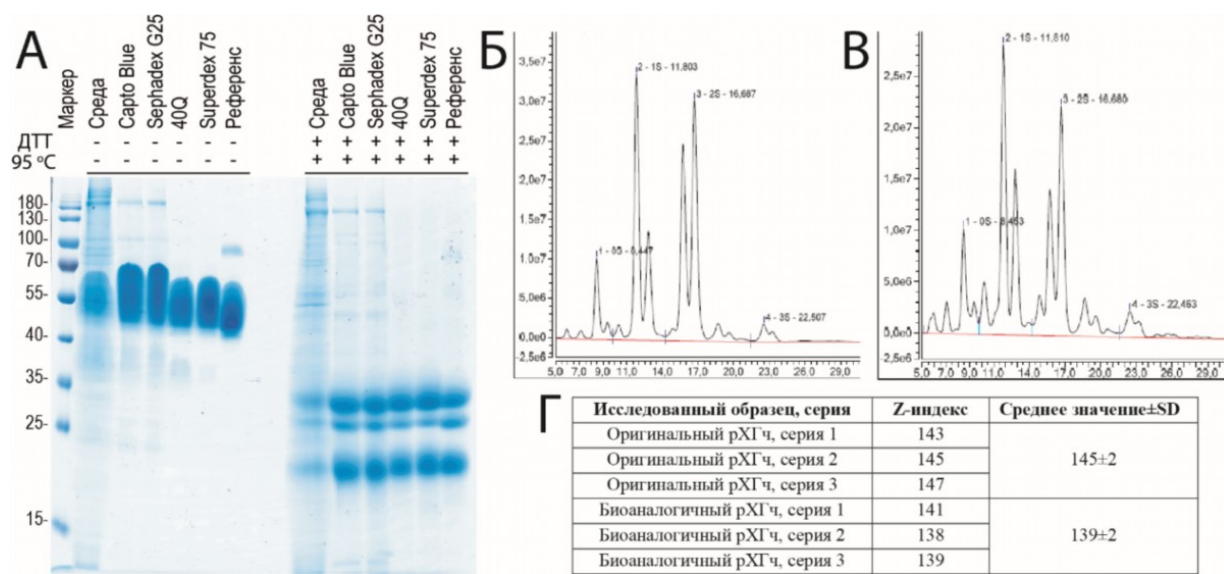


Рисунок 7. Получение высокоочищенного биоаналогичного ХГч и характеристика гликоизоформ продукта по степени синалирования (Z-индекс).

А. Электрофорез в полиакриламидном геле фракций элюатов многостадийной очистки ХГч. Референс – оригинальный препарат ХГч Овирель®.

Б, В. Хроматографический анализ отщепленных N-гликанов (Z-индекс) для оригинального ХГч (Б) и полученного биоаналогичного ХГч (В).

Г. Рассчитанный Z-индекс для оригинального и биоаналогичного ХГч.

Исследование промышленной пригодности процессов выделения и очистки рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека (рФСГч)

Полный процесс выделения рФСГч, секретируемого клеточной линией СНО С-Р1.3-FSH-G4, из культуральной среды включает две стадии инактивации патогенов, пять стадий колоночной хроматографии (Таблица 1), нанофильтрацию и стерильную формуляцию. Проведена оптимизация всех пяти хроматографических стадий в лабораторном масштабе. Для мультимодальной, иммуноаффинной и ионообменной хроматографии определили динамическую емкость связывания (dynamic binding capacity, DBC) сорбентов относительно целевого белка при оптимальном времени контакта. Для стадий эксклюзионной хроматографии определили оптимальный объем нанесения. Назначение стадий и результаты оптимизаций хроматографических параметров представлены в Таблице 1. Для всех сорбентов было показано, что число циклов эксплуатации упакованного сорбента до замены составляет не менее 40.

Таблица 1. Результаты оптимизации хроматографических стадий промышленного процесса очистки рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека (рФСГч), секретируемого клеточной линией СНО С-Р1.3-FSH-G4. $DBC_{10\%}$ – динамическая емкость связывания, оцененная при содержании 10 % ФСГ в несорбируемой фракции относительно содержания ФСГ в культуральной среде (мг ФСГ на мл сорбента); CV – объем колонки.

№	Хроматографическая стадия (<i>сорбент</i>)	Назначение стадии	Оптимизированные параметры
1.	Мультимодальная хроматография (<i>Capto MMC</i>)	Концентрирование ФСГ из культуральной среды, первичная очистка от небелковых примесей	$DBC_{10\%} = 1,9$ мг/мл Время контакта 1 мин
2.	Иммуноаффинная хроматография (<i>CaptureSelect FSH Affinity</i>)	Селективная очистка ФСГ от белков продуцента и свободных субъединиц	$DBC_{10\%} = 1,4$ мг/мл Время контакта 5 мин
3.	Гель-фильтрация (<i>Sephadex G25</i>)	Обессоливание иммуноаффинного элюата для последующего поступления на ионнообменную стадию	Объем нанесения 19 % CV
4.	Ионнообменная хроматография (<i>Capto Q</i>)	Удаление нейтральных форм ФСГ	$DBC_{10\%} = 70$ мг/мл Время контакта 1 мин
5.	Гель-фильтрация (<i>Superdex 75</i>)	Удаление мультимеров, свободных цепей ФСГ и низкомолекулярных примесей	Объем нанесения 4 % CV

Ключевая стадия очистки ФСГ, в процессе которой происходит удаление белков штамма-продуцента (БШП) и свободных субъединиц гормона, — селективное выделение ФСГ при помощи иммуноаффинного сорбента *CaptureSelect FSH Affinity*. Диапазон содержания БШП в элюатах иммуноаффинной колонки составил 10–130 нг/мг в течение 40 циклов эксплуатации колонки. Данный показатель приближается к допустимому содержанию БШП в фармацевтической субстанции ФСГ (20 нг/мг). Концентрация контаминирующих смываемых с сорбента мини-антител против ФСГ составила около 0,5–2 нг/мг ФСГ в течение 40 циклов. Это относительно низкий уровень (0,5–2 ppb), который, однако, удалось детектировать; в то же время, в трех опытно-промышленных партиях субстанции рФСГч уровень контаминирующих мини-антител находился в диапазоне 100–130 ppb. Таким образом, подтверждена высокая степень селективности очистки рФСГч при применении данного сорбента и показано, что как БШП, так и контаминирующие анти-ФСГ антитела удаляются из полуочищенного продукта во время последующих хроматографических стадий очистки практически полностью.

С использованием оптимизированного технологического процесса очистки было получено не менее 60 промышленных партий активной фармацевтической субстанции рФСГч с постоянными биохимическими свойствами и биологической активностью без замены сорбентов в большинстве хроматографических колонн. Результаты контроля качества данных партий продемонстрировали, что технологический процесс выделения и очистки рФСГч был эффективно масштабирован до размера промышленного производства и позволяет получать биофармацевтический продукт с воспроизводимыми характеристиками от партии к партии, успешно применяемый в клинической практике.

Практическое использование научных результатов

1. Очищенный антиген RBD SARS-CoV-2 успешно применялся в качестве реагента для производства иммунохроматографического набора для качественного обнаружения антител IgG/IgM к SARS-CoV-2 в сыворотке, плазме и цельной крови человека «АИН SARS-CoV-2 CoronaPass-IgG/IgM» (производство ООО «АИН», ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, зарегистрирован в РФ в 2020 г.)
2. Линии-продуценты ХГч D-pTr2-hCG-55 и S-pTr2-hCG-8 депонированы в коллекцию ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика под номерами Н-194 и Н-213 соответственно. Получен патент на способ получения рекомбинантного ХГч (RU 2834784). С использованием линии S-pTr2-hCG-8 на площадке ООО «Завод Медсинтез» проведено три опытно-промышленных культивации в биореакторе, достигнут титр продукта не менее 100 мг/л, проведена многостадийная очистка ХГч из культуральной жидкости и изготовление готовой лекарственной формы (ГЛФ). Разработанные методики контроля качества включены в проект нормативной документации на субстанцию и ГЛФ первого отечественного рекомбинантного ХГч, планируемого к выпуску в одноразовых шприц-ручках. Лекарственный препарат, содержащий биоаналогичный ХГч, успешно прошел доклинические испытания, и в настоящий момент его фармакокинетические свойства исследуются в сравнительном регистрационном клиническом исследовании с участием здоровых добровольцев.
3. Результаты исследования промышленной пригодности процессов очистки рФСГч включены в промышленный регламент на производство активной фармацевтической субстанции рФСГч, которая входит в состав лекарственного препарата Примапур®, зарегистрированного в России в 2019 г. (владелец регистрационного удостоверения – ООО «АйВиФарма», Россия). За шесть лет ООО «Завод Медсинтез» (г. Новоуральск, Россия) было выпущено 62 промышленные партии лекарственного препарата Примапур® в виде шприц-ручек для применения в специализированных медицинских учреждениях по лечению бесплодия у человека, более 40 000 детей родилось в России с использованием данного лекарственного препарата.

Выводы

1. Установлено, что ключевыми элементами, определяющими долговременную стабильность экспрессии в плазмиде p1.1, являются некодирующий участок ДНК гена EEF1A1 размером 2,5 т.п.о., лежащий выше по течению от промотора, а также фрагмент конкатемера длинного концевого повтора вируса Эпштейна-Барр (EBVTR).
2. Показано, что рациональный дизайн RBD (удаление неспаренного цистеина, оптимизация границ домена) позволяет многократно увеличить выход мономерной формы рецептор-связывающего домена (RBD) SARS-CoV-2 с сохранением высокой аффинности и специфичности биохимического взаимодействия как с его рецептором, ангиотензин-превращающим ферментом 2 (АПФ2), так и с антителами переболевших COVID-19.
3. Разработан биохимический тест сВНТ, основанный на количественном измерении ингибирования высокоаффинного белок-белкового взаимодействия RBD-АПФ2 нейтрализующими антителами. Показана высокая корреляция результатов теста сВНТ с классическим тестом вирус-нейтрализации, что подтверждает пригодность разработанного теста для оценки уровня нейтрализующих антител при клиническом применении.
4. Показано, что замена нативного сигнального пептида (СП) β -цепи гликопротеиновых гормонов на гетерологичный (в частности, СП альбумина человека) статистически значимо и многократно повышает уровень секреции зрелых гетеродимеров для трёх из четырёх изученных гормонов. Биохимический механизм данного эффекта заключается в повышении эффективности котрансляционной транслокации в эндоплазматический ретикулум.
5. Получен сбалансированный промышленный продуцент ХГч. Использование двух сублиний СНО в качестве родительских клеток выявило их различную способность к посттрансляционной модификации (гликозилированию) гормона. Оптимизированный процесс получения ХГч обеспечивает не только высокий титр продукта (более 100 мг/л), но и корректный биохимический профиль и требуемую биологическую активность гормона.
6. Доказана промышленная пригодность процесса хроматографической очистки рФСГч, секретлируемого клеточной линией С-Р1.3-FSH-G4. Разработанный процесс обеспечивает эффективное удаление примесей при сохранении нативной биохимической структуры и активности гормона.

Список научных трудов, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. Sinegubova M.V., Orlova N.A., Kovnir S.V., Dayanova L.K., Vorobiev I.I. High-level expression of the monomeric SARS-CoV-2 S protein RBD 320-537 in stably transfected CHO cells by the EEF1A1-based plasmid vector. // **PLoS One**. – 2021. – Vol. 16(2). – P.e0242890.
2. Kolesov D.E., Sinegubova M.V., Dayanova L.K., Dolzhikova I.V., Vorobiev I.I., Orlova N.A. Fast and Accurate Surrogate Virus Neutralization Test Based on Antibody-Mediated Blocking of the Interaction of ACE2 and SARS-CoV-2 Spike Protein RBD. // **Diagnostics**. – 2022. – Vol.12(2). – P.393.
3. Sinegubova M., Vorobiev I, Klishin A, Eremin D, Orlova N, Orlova N, Polzikov M. Purification Process of a Recombinant Human Follicle Stimulating Hormone Biosimilar (Primapur®) to Yield a Pharmaceutical Product with High Batch-to-Batch Consistency. // **Pharmaceutics**. – 2022. – Vol. 14(1). – P. 96.
4. Sinegubova M.V., Orlova N.A., Vorobiev I.I. 2023. Promoter from Chinese hamster elongation factor-1a gene and Epstein-Barr virus terminal repeats concatemer fragment maintain stable high-level expression of recombinant proteins. // **PeerJ**. – 2023. – Vol.11. – P.e16287.
5. Sinegubova M.V., Kolesov D.E., Dayanova L.K. et al. Enhancing human glycoprotein hormones production in CHO cells using heterologous beta-chain signal peptides. // **Doklady Biochemistry and Biophysics**. – 2024. – Vol. 514(1). – P.1–5.
6. Sinegubova M.V., Kolesov D.E., Vorobiev I.I., Orlova N.A. Increased glycoprotein hormone yield in stably transfected CHO cells using human serum albumin signal peptide for beta-chains. // **PeerJ**. – 2025. – Vol.13. – P. e18908.

Тезисы докладов

1. Синегубова М.В., Орлова Н.А., Ползиков М.А., Воробьев И.И. Исследование промышленной пригодности процессов выделения и очистки рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека. // Сборник тезисов XXXI Зимней молодёжной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (11–14 февраля 2019 г.). – М.: Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. – С. 135.
2. 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. // Сборник тезисов 23-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (15–19 апреля 2019 г.), Пущино [Электронный ресурс]. – 2019. – С. 148.
3. Синегубова М.В., Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьев И.И. Получение рецептор-связывающего домена шиповидного белка SARS-CoV-2 в стабильно трансфицированных клетках линии CHO. // Сборник тезисов XXXI Зимней молодёжной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (8–11 февраля 2021 г.) – М.: Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. – С. 166.
4. Колесов Д.Э., Синегубова М.В., Даянова Л.К., Орлова Н.А., Воробьев И.И. Суррогатный метод определения вирус-нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 при помощи конъюгата ангиотензин-превращающего фермента 2 с пероксидазой хрена и интактного рецептор-связывающего домена шиповидного белка. // XXXIV Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Сборник тезисов. – Москва, 8–11 февраля 2022 г. – С. 107.

5. Синегубова М.В., Орлова Н.А., Кочина Я.А., Воробьев И.И. Балансировка относительного уровня экспрессии цепей рекомбинантных гонадотропинов. // XXXIV Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Сборник тезисов. – Москва, 8–11 февраля 2022 г. – С. 118.
6. Ползиков М.А., Синегубова М.В., Воробьев И.И., Клишин А.А., Еремин Д.В., Орлова Н.А., Орлова Н.В. Российский рекомбинантный фоллитропина α : от разработки и контроля качества до реальной клинической практики. // Охрана материнства и детства. Издательство Витебского государственного медицинского университета. – 2022. – № 2 (40). – С. 109.
7. Колесов Д.Э., Синегубова М.В., Орлова Н.А., Воробьев И.И. Замена нативных сигнальных пептидов β -цепей гликопротеиновых гормонов на сигнальный пептид человеческого сывороточного альбумина приводит к повышению титра гетеродимерных гормонов в культуральной среде. // Сборник трудов четвертого студенческого биохимического форума. – г. Москва, 30 марта-1 апреля 2024 года. – С. 124.
8. Синегубова М.В., Воробьев И.И., Орлова Н.А., Зырянов Д.А., Клишин А.А., Ползиков М.А. Получение биоаналогичного хорионического гонадотропина человека в культуре клеток китайского хомяка. // Сборник XXXIV Ежегодной международной конференции РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра». – г. Екатеринбург, 4-7 сентября 2024 г. – С. 40–41.
9. Синегубова М.В., Колесов Д.Э., Воробьев И.И., Орлова Н.А. Увеличение титра гликопротеиновых гормонов в стабильно трансфицированных клетках СНО при помощи сигнального пептида человеческого сывороточного альбумина для β -цепей. // Физико-химическая биология в год 270-летия МГУ. Сборник материалов международной научной конференции, посвященной 120-летию со дня рождения академика А. Н. Белозерского и 90-летию со дня рождения академика В. П. Скулачёва, Москва, 20–22 февраля 2025 г. / под общ. ред. П. В. Сергиева. – Москва: Издательство Московского университета. – 2025. – С. 145–146.
10. Синегубова М.В., Воробьев И.И., Орлова Н.А., Зырянов Д.А., Клишин А.А., Ползиков М.А. Получение сбалансированного продуцента хорионического гонадотропина человека в культуре клеток СНО при помощи пары би- и трицистронных плазмид. // Сборник материалов Саммита разработчиков лекарственных средств «Сириус. Биотех», ФТ Сириус, 21–23 мая 2025 г. – Москва: ООО «Альпен-Принт». – 2025. – С. 256–258.
11. Колесов Д.Э., Синегубова М.В., Орлова Н.А., Воробьев И.И. Определение точек инсерции целевых плазмид в геном и анализ событий геномной амплификации для линии-продуцента на основе клеток СНО при помощи секвенирования OXFORD NANOPORE. // Сборник материалов Саммита разработчиков лекарственных средств «Сириус. Биотех», ФТ Сириус, 21–23 мая 2025 г. – Москва: ООО «Альпен-Принт». – 2025. – С. 249–251.
12. Орлова Н.А., Синегубова М.В., Колесов Д.Э., Ходак Ю.А., Воробьев И.И. Устранение узких мест в экспрессии биотехнологически значимых белков культивируемыми клетками китайского хомячка с помощью биоинженерии секреторного пути. // Сборник материалов Саммита разработчиков лекарственных средств «Сириус. Биотех», ФТ Сириус, 21–23 мая 2025 г. – Москва: ООО «Альпен-Принт». – 2025. – С. 251-252.

Патент

1. Воробьев И.И., Орлова Н.А., Синегубова М.В., Клишин А.А., Зырянов Д.А. Плазмиды для экспрессии рекомбинантного хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), плазмиды для экспрессии рекомбинантных альфа- и бета-субъединиц ХГЧ, моноклональные линии клеток млекопитающих – продуценты ХГЧ, способ получения рекомбинантного ХГЧ. // Патент РФ 2834784. Приоритет от 12.02.2024. // Бюл. "Изобретения. Полезные модели", № 5, 14.02.2025.