

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-143

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЭРИТРОПОЭТИНА ЧЕЛОВЕКА *

PRODUCTION OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN

Д. А. Филиппова^{1,2}, Н. Б. Рудометова², Л. А. Кисакова², Д. Н. Кисаков², Т. Е. Петухова²,
О. Ю. Рыбалкина³, Л. А. Ан³, И. С. Черняев³, А. П. Рудометов², Л. И. Карпенко²

¹*Новосибирский государственный университет*

²*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

³*НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ РАН*

D.A. Filippova^{1,2}, N. B. Rudometova², L. A. Kisakova², D. N. Kisakov², T. E. Petukhova²,
O. Y. Rybalkina³, L. A. An³, I. S. Chernyaev³, A. P. Rudometov², L. I. Karpenko²

¹*Novosibirsk State University*

²*State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo*

³*E.D. Goldberg Research Institute of Physics and Mathematics, Tomsk Scientific Center RAS*

✉ filippda73@yandex.ru

Аннотация

Существует целый ряд заболеваний, включая онкологические, вирусные и соматические, сопровождающихся развитием симптоматической анемии. Одной из причин вторичной анемии является снижение или полное прекращение синтеза эритропоэтина, что делает заместительную терапию этим гормоном важным компонентом лечения. В настоящее время в России существует потребность в получении дешевого и доступного препарата эритропоэтина из перечня ЖНВЛП.

Abstract

There are a number of diseases, including cancer, viral diseases, and somatic diseases, which can lead to symptomatic anemia. One of the causes of secondary anemia is a decrease or complete cessation of erythropoietin synthesis, which makes hormone replacement therapy an important component of treatment. Currently, there is a need in Russia to obtain a cheap and accessible erythropoietin drug from the list of essential medicines.

Эритропоэтин (EPO) — гормон, регулирующий эритропоэз, стимулирует созревание эритроцитов; кислый гликопротеин из 165 аминокислот и четырех углеводных цепей; структура — глобула с четырьмя антипараллельными α -спиралями, двумя β -складками, двумя внутренними дисульфидными связями, необходимыми для активности.

На первом этапе была разработана аминокислотная последовательность гена эритропоэтина на основе EPO человека — P01588_EPO_HUMAN. В природный ген добавлены сигнальная последовательность GLuc (на N-конец) и His-тэг (6×His) — на C-конец для очистки. Проведена обратная трансляция (https://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html) и оптимизация кодонов для экспрессии в клетках млекопитающих (<https://www.jcat.de/>).

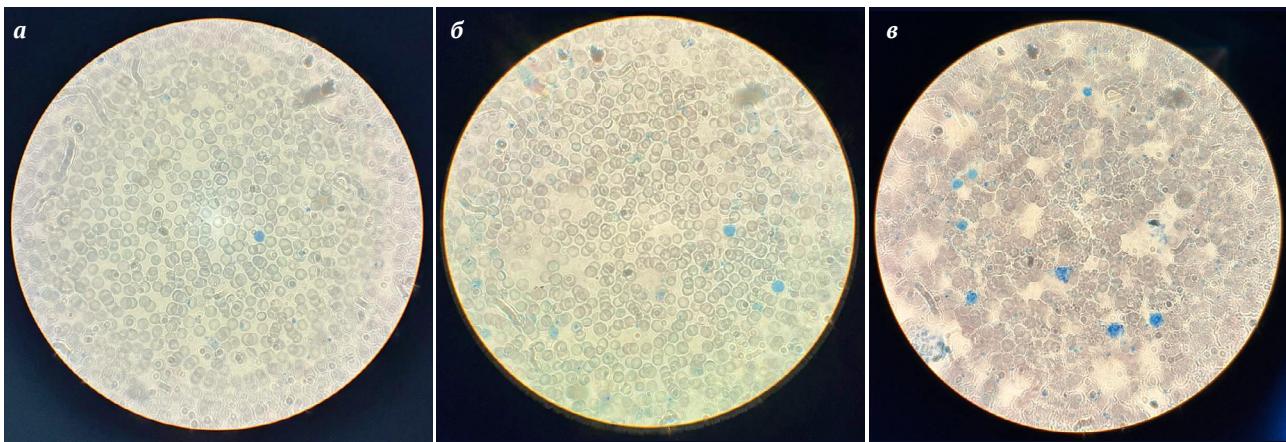
Ген синтезировали и клонировали в составе интегриционного плазмидного вектора. Стабильный производитель EPO получали на клеточной линии CHO-K1 с применением системы Sleeping Beauty transposon system (<https://blog.addgene.org/sleeping-beauty-awakens-for-genome-engineering>).

Экспрессию трансгена подтверждали вестерн-блотом с использованием моноклонального антитела к 6×His. В культуральной среде обнаружен белок массой 34 кДа, соответствующий EPO. Проводили очистку белка с использованием хроматографического сорбента Ni-IMAC (VDO BioTech), степень очистки оценивали методом электрофореза в ПААГ. Фракции с целевым белком дилизировали против фосфатно-солевого буфера, концентрировали, подтверждали наличие EPO в концентрате электрофорезом в ПААГ.

Функциональную активность препарата оценивали на мышах линии Balb/c, препарат вводили подкожно. Через 3 суток производили забор крови, окрашивание препаратов крови раствором бриллиантового крезилового синего, микроскопирование (увеличение 100×). Обнаружено увеличение числа ретикулоцитов по сравнению с интактными животными, что подтверждает стимулирующее действие препарата EPO в созревании эритроцитов (см. рисунок).

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВВ «Вектор» Роспотребнадзора.

© Д. А. Филиппова, Н. Б. Рудометова, Л. А. Кисакова, Д. Н. Кисаков, Т. Е. Петухова, О. Ю. Рыбалкина, Л. А. Ан, И. С. Черняев, А. П. Рудометов, Л. И. Карпенко, 2025



Микрофотографии образцов крови мышей после введения препарата ЕРО и окрашивания раствором крезилового синего:
 а — образец крови интактной мыши (отрицательный контроль); б — образец крови мыши после подкожного введения коммерческого препарата эритропоэтина в концентрации 80 МЕ/мл (положительный контроль); в — образец крови мыши после подкожного введения очищенного рекомбинантного препарата эритропоэтина (10 нг)

Было определено общее количество эритроцитов и содержание гемоглобина и гематокрита с помощью анализатора Mythic 18 vet в периферической крови доксорубицин-индуцированных (доза — 6 мг/кг) анемичных мышей линии C57BL/6 после введения полученного препарата ЕРО и коммерческого препарата «Рекормон» (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Швейцария). «Рекормон» вводили подкожно пятикратно ежедневно в дозе 10 ЕД/мышь (суммарная доза 50 ЕД/мышь), полученный препарат ЕРО вводили ежедневно подкожно в количестве 20 нг (суммарная доза 100 нг). В первый день введения оба препарата были введены за 24 ч до введения доксорубицина (см. таблицу).

Количество эритроцитов и содержание гемоглобина и гематокрита на третий день опыта

| Критерий | Интактная группа | Доксорубицин | Доксорубицин + «Рекормон» | Доксорубицин + препарат ЕРО, 100 нг |
|------------|------------------|------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| Эритроциты | $11,43 \pm 1,13$ | $7,66 \pm 0,67$ | $10,89 \pm 0,32$ $P < 0,01$ | $10,92 \pm 0,12$ $P < 0,01$ |
| Гемоглобин | $15,94 \pm 0,60$ | $10,40 \pm 0,43$ | $17,36 \pm 0,56$ $P < 0,01$ | $10,12 \pm 0,23$ $P < 0,01$ |
| Гематокрит | $39,62 \pm 3,90$ | $30,82 \pm 3,36$ | $42,00 \pm 1,28$ $P < 0,01$ | $41,86 \pm 0,79$ $P < 0,01$ |

Согласно результатам, представленным в таблице, полученный препарат ЕРО демонстрирует сопоставимую эффективность с коммерческим препаратом по всем основным показателям. При этом у полученного препарата наблюдается меньшая стандартная погрешность, что указывает на более стабильный эффект. Таким образом, он не уступает коммерческому аналогу и превосходит его по воспроизводимости, что делает его перспективным для дальнейших исследований.