

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

## ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЭРИТРОПОЭТИНА ЧЕЛОВЕКА\*

## PRODUCTION OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN

Д. А. Филиппова<sup>1,2</sup>, Н. Б. Рудометова<sup>2</sup>, Л. А. Кисакова<sup>2</sup>, Д. Н. Кисаков<sup>2</sup>, Т. Е. Петухова<sup>2</sup>,  
О. Ю. Рыбалкина<sup>3</sup>, Л. А. Ан<sup>3</sup>, И. С. Черняев<sup>3</sup>, А. П. Рудометов<sup>2</sup>, Л. И. Карпенко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский государственный университет

<sup>2</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

<sup>3</sup>НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга Томского НИМЦ РАН

D. A. Filippova<sup>1,2</sup>, N. B. Rudometova<sup>2</sup>, L. A. Kisakova<sup>2</sup>, D. N. Kisakov<sup>2</sup>, T. E. Petukhova<sup>2</sup>,  
O. Y. Rybalkina<sup>3</sup>, L. A. An<sup>3</sup>, I. S. Chernyaev<sup>3</sup>, A. P. Rudometov<sup>2</sup>, L. I. Karpenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Novosibirsk State University

<sup>2</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

<sup>3</sup>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 (ЕРО) — гормон, регулирующий эритропоэз, стимулирует созревание эритроцитов; кислый гликопротеин из 165 аминокислот и четырех углеводных цепей; структура — глобула с четырьмя антипараллельными  $\alpha$ -спиралями, двумя  $\beta$ -складками, двумя внутренними дисульфидными связями, необходимыми для активности.

На первом этапе была разработана аминокислотная последовательность гена эритропоэтина на основе ЕРО 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](https://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html)) и оптимизация кодонов для экспрессии в клетках млекопитающих (<https://www.jcat.de/>).

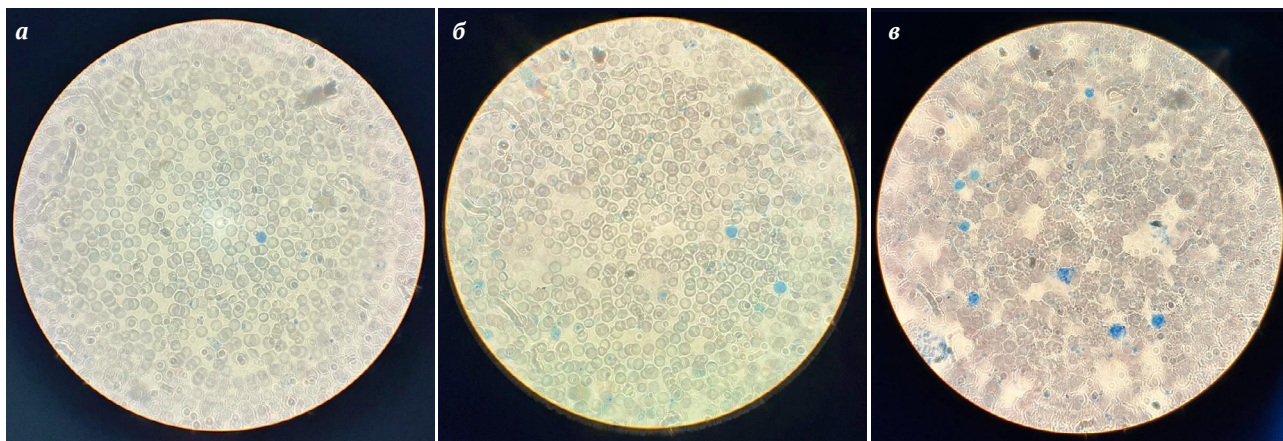
Ген синтезировали и клонировали в составе интеграционного плазмидного вектора. Стабильный продуцент ЕРО получали на клеточной линии CHO-K1 с применением системы Sleeping Beauty transposon system (<https://blog.addgene.org/sleeping-beauty-awakens-for-genome-engineering>).

Экспрессию трансгена подтверждали вестерн-блотом с использованием моноклонального антитела к 6×His. В культуральной среде обнаружен белок массой 34 кДа, соответствующий ЕРО. Проводили очистку белка с использованием хроматографического сорбента Ni-IMAC (VDO BioTech), степень очистки оценивали методом электрофореза в ПААГ. Фракции с целевым белком диализовали против фосфатно-солевого буфера, концентрировали, подтверждали наличие ЕРО 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 крезильного синего, микроскопирование (увеличение 100×). Обнаружено увеличение числа ретикулоцитов по сравнению с интактными животными, что подтверждает стимулирующее действие препарата ЕРО в созревании эритроцитов (см. рисунок).

\* Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «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 кризолового 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 доксорубин-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 доксорубина (см. таблицу).

#### Количество эритроцитов и содержание гемоглобина и гематокрита на третий день опыта

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