

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Есипов Роман Станиславович

МЕТОДОЛОГИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОЛУЧЕНИЯ
РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЕПТИДОВ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Специальность 03.01.06. – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Москва - 2019

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

Научный консультант:

Академик РАН, д.х.н., проф. Мирошников Анатолий Иванович

Официальные оппоненты:

Чл.-корр. РАН, д.х.н., проф. Кочетков Сергей Николаевич, заведующий лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (ИМБ РАН)

Чл.-корр. РАН, д.х.н., проф. Костров Сергей Викторович, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики РАН (ИМГ РАН)

Д.б.н. Лунин Владимир Глебович, заведующий лабораторией биологически активных наноструктур отдела генетики и молекулярной биологии бактерий Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ («НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» («НИЦ "Курчатовский институт" – ГосНИИГенетика»)

Защита состоится 23 октября 2019 г. в 10.00 на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) по адресу: 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте института www.ibch.ru

Автореферат разослан «____» _____ 2019 года

Ученый секретарь Диссертационного совета,
Д.ф.-м.н.



Олейников В.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Возникновение биотехнологии в 70-х годах XX века стало отправной точкой в создании и развитии индустрии получения промышленных биофармацевтических препаратов (biopharmaceuticals). Уже через 40 лет на рынке фармакологических средств сегмент биофармацевтических препаратов составил примерно 25%. Практически половину продаж обеспечивают моноклональные антитела, гормоны и ростовые факторы, причем спрос на эти препараты продолжает расти.

Несмотря на развитие новых направлений по созданию инновационных лекарственных средств, пептиды до сих пор остаются привлекательными объектами в качестве биофармацевтических препаратов в связи с их безопасным фармакологическим профилем, хорошей переносимостью и эффективностью терапевтического использования. В стоимостном выражении мировой рынок пептидных лекарств вырос с 14.1 млрд. долл. в 2011 году до 25.4 млрд. долл. в 2018 году, при этом базовый рост новых инновационных пептидных лекарств составил от 8.6 млрд. долл. в 2011 году (60 %) до 17.0 млрд. долл. (66%) в 2018 году. В настоящее время на рынке США имеется более 239 утвержденных FDA пептидных препаратов и 380 их готовых лекарственных форм, клинические испытания проходят около 140 и более 500 терапевтических пептидов находятся на стадии доклинической разработки.

Примером инновационных разработок в этой области стало создание группы препаратов для лечения сахарного диабета 2 типа на основе агонистов глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1). Объем их продаж в 2013 году достиг более 2.6 млрд долларов США. Наиболее значимый представитель этого класса – препарат Victoza (Novo Nordisk, США), достигший статуса «блокбастера».

Получение таких препаратов является дорогостоящим процессом из-за высокой себестоимости технологий полного химического синтеза. Альтернативой химическому синтезу пептидов является биотехнологический

подход, основанный на использовании живых организмов в качестве биологических продуцентов целевых соединений.

Несмотря на новые, все более совершенные системы экспрессии для получения разнообразных белков, бактериальные системы по-прежнему остаются весьма привлекательными из-за низкой цены, высокой производительности и легкости в использовании. Это вполне закономерно, так как огромный информационный багаж фундаментальных знаний по биохимии, генетике, физиологии прокариотических организмов, в том числе *E.coli*, предопределил развитие и использование именно бактериальной платформы для биосинтеза небольших белков и полипептидов.

Следует отметить, создание препаратов медицинского назначения на основе рекомбинантных пептидов в прокариотических системах является непростой задачей, требующей решения как научных, так и технологических вопросов. Принципиальным недостатком прокариотической системы экспрессии является наличие у белков N-концевого формилметионина, который необходимо удалять для подавляющего числа полипептидов, применяемых в медицине. Еще более сложная ситуация, когда для проявления природной биологической активности пептидов необходима посттрансляционная модификация. Кроме того, полипептиды размером от 3 до 6 кДа, лишенные жесткой третичной структуры, часто подвергаются протеолизу *in vivo*. Для использования в научных исследованиях такие пептиды обычно получают в составе гибридного белка, что недопустимо для медицинского препарата. Для получения полипептидов медицинского назначения применяются два основных подхода удаления вспомогательных последовательностей. В первом случае отщепление лидерной последовательности от гибридного белка и высвобождение целевого пептида происходит за счет внутриклеточных протеаз *in vivo*. Однако, в этом случае выход целевого полипептида, как правило, невысокий. Во-втором случае используются сайт-специфические протеазы для отщепления целевого пептида от белка-носителя *in vitro*. В научной литературе описан целый ряд

схем получения белков с использованием высокоспецифических протеиназ, таких как, энтерокиназа, фактор Ха или TEV протеаза и др. Для каждого конкретного белка приходится решать задачу по выбору соответствующего фермента, учитывая влияние первой и второй аминокислоты целевого пептида на эффективность протеолитического гидролиза, а также задачу наработки фермента в требуемом количестве.

Альтернативным подходом является использование интеинов в составе гибридного белка, которые могут при определенных условиях выполнить роль фермента и осуществить специфическое автокаталитическое расщепление с отделением целевого пептида. Преимущество такого подхода заключается в том, что интеиновый домен с аффинной меткой выполняет сразу две функции: белка-носителя и высокоспецифичной протеазы. При этом такой подход так же имеет ряд ограничений. Во-первых, классическая активация интеинового расщепления слитого белка происходит в присутствии тиольных реагентов в узком диапазоне pH, что существенно ограничивает возможности использования этого подхода для гибридных белков с близкой изоэлектрической точкой. Второе ограничение связано с первичной структурой целевого пептида: если первым аминокислотным остатком полипептида являются Cys, Ser, Glu, Asp, His, то высока вероятность расщепления и сплайсинга на стадии культивирования штамма-продуцента. Немаловажной задачей для успешной реализации интеиновой технологии является получение *in vivo*, при ферментации, или *in vitro*, на стадии рефолдинга, растворимого и правильно свернутого интеинового домена в составе гибридного белка. Поэтому оценка перспективы использования для промышленного биотехнологического производства экспрессионных систем на основе интеинов при создании биофармацевтических полипептидных препаратов, является актуальной задачей и предполагает проведение масштабных исследований.

Цель и задачи работы. Целью данной работы является разработка методологии биотехнологических процессов биосинтеза рекомбинантных

биологически активных полипептидов и создание на ее основе биотехнологий получения активных фармацевтических субстанций, предназначенных для приготовления готовых лекарственных форм.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие задачи исследования:

- 1) разработать методологические подходы по применению интеиновых экспрессионных систем в создании биотехнологий получения рекомбинантных пептидов медицинского назначения,
- 2) создать высокопродуктивные штаммы-продуценты гибридных белков, содержащих целевой полипептид и белок-носитель,
- 3) разработать подходы получения растворимых гибридных белков, способных к протеолитическому расщеплению, включая оптимизацию условий рефолдинга,
- 4) разработать биотехнологии получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов медицинского назначения,
- 5) разработать методы поэтапного технологического контроля получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантных полипептидов и готовых лекарственных форм,
- 6) масштабировать технологический процесс и наработать опытные партии для проведения доклинических испытаний,
- 7) разработать методы анализа конечного продукта, включая тестирование биологической активности, и проекты фармакопейных статей для полученных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов и готовых лекарственных форм,
- 8) разработать опытно-промышленные регламенты на биотехнологическое получение активных фармацевтических субстанций и готовых лекарственных форм.

Научная новизна. Разработана и реализована биотехнологическая концепция получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов, основанная на применении элементов

белкового сплайсинга. Показаны возможности и ограничения биотехнологического применения интеиновых структур для получения рекомбинантных полипептидов. На примерах получения конкретных полипептидов продемонстрирован альтернативный биотехнологический подход с использованием элементов белкового сплайсинга, предполагающий отказ от использования специфических протеаз. Разработана технология получения природных молекул тимозина $\alpha 1$ и тимозина $\beta 4$ за счет ацетилирования N-концевого серина *in vivo*. Получены новые молекулы, обладающие антиангиогенным эффектом, подтвержденным на многочисленных животных и клеточных моделях

Практическая значимость исследования. Все созданные в ходе работы технологии получения активных фармацевтических субстанций (АФС) масштабированы до уровня пилотного производства. Разработаны опытно-промышленные технологические регламенты на получение соответствующих препаратов. По этим регламентам были наработаны опытные партии активных фармацевтических субстанций для проведения доклинических исследований. Технология получения рекомбинантного глюкагона человека легла в основу опытно-промышленного регламента получения АФС и промышленного регламента производства готовой лекарственной формы – «Глюкоран, глюкагон рекомбинантный, человеческий генноинженерный, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 1 МЕ». Для этого препарата в полном объеме проведены доклинические исследования, собран комплект документов регистрационного досье в Минздравсоцразвития РФ и получены необходимые разрешения для проведения клинических испытаний

Личный вклад автора заключается в постановке целей и формулировании задач представленного исследования, непосредственном выполнении экспериментов, анализе и обобщении полученных результатов, организации проведения доклинических исследований полученных фармацевтических

субстанций, а также организации опытно-промышленного производства по разработанным технологическим регламентам.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Разработан интеин-опосредованный биотехнологический подход получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов на основе гибридного белка, содержащего элементы белкового сплайсинга, не требующий применения специфических протеаз.
2. Разработан интеин-опосредованный биотехнологический способ получения рекомбинантных тимозина $\alpha 1$ и тимозина $\beta 4$ человека, исключаяющий стадию химического ацетилирования пептида.
3. Разработаны опытно-промышленные биотехнологии получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов на основе гибридных белков, содержащих тиоредоксин А, целевой полипептид и сайт узнавания TEV протеиназы.
4. С использованием разработанных технологических подходов созданы опытно-промышленные технологии получения активных фармацевтических субстанций следующих рекомбинантных полипептидов: тимозина $\alpha 1$, тимозина $\beta 4$, глюкагона, модифицированного фрагмента тумстатина (тумастин), аналогов гирудина (лепирудин и дезирудин), эпидермального фактора роста, оксинтомодулина (оксинтолонг), модифицированного фрагмента фактора дифференцировки пигментного эпителия (пигастин), окситоцина, анальгетического пептида АРНС-3 (пептальгин), анальгетического пептида РТ-1 (пунальгин).
5. Для всех созданных технологий разработаны методы технологического контроля и анализа конечного продукта, включая тестирование биологической активности.
6. Разработана технологическая документация (опытно-промышленные технологические регламенты).

7. На клеточных и животных моделях показана высокая специфическая биологическая активность следующих фармацевтических субстанций: тимозина $\beta 4$, глюкагона, эпидермального фактора роста, оксинтолонга, пигастина, тумстатина, лепирудина, дезирудина, пептальгина и пунальгина.

Апробация работы

Публикации. Материалы диссертационной работы опубликованы в 22 статьях в международных и отечественных научных журналах, получено 13 патентов РФ. Результаты диссертационной работы были представлены на 34 российских и международных научных симпозиумах и конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 224 страницах, включая 117 рисунков, 11 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 385 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Выбранный нами биотехнологический путь получения полипептидных препаратов медицинского назначения основан на идее микробиологического биосинтеза целевого пептида в составе рекомбинантного гибридного белка с последующим его специфическим расщеплением и выделением необходимого продукта. Серьезным ограничением для такого подхода в получении пептидов медицинского назначения является требование строгого соблюдения неизменности структуры получаемого продукта. Любые дополнительные модификации целевого пептида, облегчающие его получение (добавление лидерного пептида, tag-последовательностей или замена какой-либо аминокислоты в конечном продукте), являются абсолютно недопустимыми. Это обстоятельство существенно сокращает методический арсенал и сводит все многообразие биотехнологических методов к весьма ограниченному набору. Фактически путь через биосинтез гибридного белка

сводится двум вариантам белковой инженерии: специфическое расщепление по сайту соответствующей протеиназой или автокаталитическое расщепление за счет использования интеиновых структур. Разрабатывая биотехнологии получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных биологически активных полипептидов, в данной работе были использованы оба варианта. Это позволило не только выбрать оптимальную стратегию для конкретного полипептида с учетом особенностей его первичной структуры, но и сравнить эффективность обоих технологических решений.

1. Разработка экспрессионной системы на основе интеинов для получения полипептидов с N-концевым серином на примере тимозина- α 1 человека

Как уже отмечалось ранее, одним из основных недостатков интеиновых систем является высокая вероятность преждевременного автокаталитического расщепления (сплайсинга), если первая аминокислота целевого белка серин или цистеин. Поэтому первым этапом работы в этом направлении была попытка изменения протокола использования интеиновой системы IMPACT-CN, в которой роль белка-носителя выполняет интеин VMA из *Saccharomyces cerevisiae*. Целевым пептидом с N-концевым серином стал тимозин- α 1 человека. Тимозин- α 1 (T α 1), представляющий собой сравнительно короткий 28-членный полипептид (Рис. 1), осуществляет модуляцию иммунной системы и стимулирует дифференциацию и активацию Т-клеток. Идея по изменению протокола заключалась в разработке цинк-зависимого способа остановки сплайсинга интеина SceVMA на стадии автокаталитического расщепления. Поскольку процесс белкового сплайсинга представляет собой каскад согласованных внутримолекулярных реакций, в ходе которых все перегруппировки происходят в пространстве с определенными скоростями, то изменение скорости одной из стадий может

привести к разбалансировке всего процесса сплайсинга при сохранении способности к автокаталитическому расщеплению.

**Ac-Ser-Asp-Ala-Ala-Val-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile-Thr-Thr-Lys-Asp-Leu
-Lys-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn-OH**

Рис. 1. Аминокислотная последовательность тимозина- $\alpha 1$.

Синтетический ген тимозина- $\alpha 1$ был клонирован в экспрессионный вектор pTYB11 (New England Biolabs). При трансформации созданным вектором pERTHym1 клеток штамма *E.coli* ER2566 был получен штамм-продуцент *E.coli* ER2566/pERTHym1. Исследование продуктов биосинтеза белка в ходе культивирования показало, что до 70 % гибридного белка расщепляется *in vivo*.

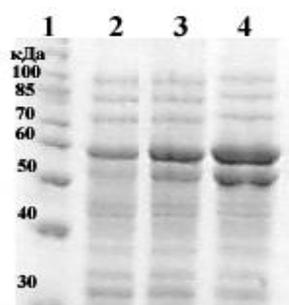


Рис. 2. Электрофоретический анализ биосинтеза гибридного белка в штамме *E.coli* ER2566/pERTHym1. 15%-ДСН-ПААГ.

А – гибридный белок *SceVMA-T $\alpha 1$* ;

Б – интеин *SceVMA*,

1 – маркеры молекулярных масс.

2 – 4 - тотальные лизаты клеток при различных концентрациях в буфере $ZnCl_2$: **2** – 10 мМ, **3** – 3 мМ $ZnCl_2$. **4** – 0 мМ.

Было исследовано ингибирующее влияние ионов цинка (в диапазоне концентраций от 1 до 10 мМ $ZnCl_2$) на процесс лигирования по соотношению продуктов расщепления и сплайсинга (Рис. 2). Оказалось, что оптимальной является концентрация 2 мМ, при которой образовывалось не более 35% продуктов расщепления гибридного белка (Рис. 3). Дальнейшее увеличение концентрации хлорида цинка приводило к резкому снижению выхода биомассы и количества гибридного белка относительно общего белка клетки, а уменьшение концентрации – к значительному увеличению продуктов сплайсинга (Рис. 3). Было проведено выделение дезацетилтимозина- $\alpha 1$ с помощью аффинной хроматографии на хитиновом сорбенте и ОФ ВЭЖХ. Выход составил около 3 мг полипептида с литра клеточной культуры. Этот результат является вполне удовлетворительным при лабораторной наработке

целевого полипептида для научных целей, но не может быть использован при промышленном получении фармацевтических препаратов.

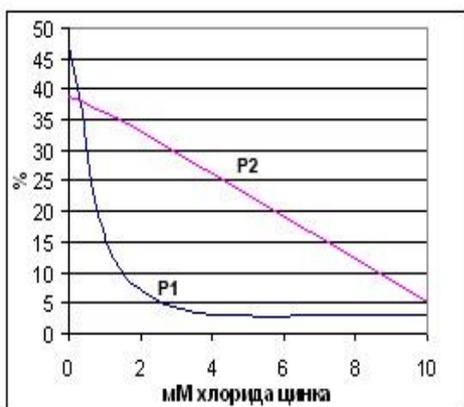


Рис. 3. Влияние концентрации $ZnCl_2$ на уровень биосинтеза гибридного белка и образование продуктов сплайсинга в процессе ферментации.

P1 – процентное отношение отщепленного интеина к исходному гибриднему белку.

P2 – процентное содержание гибридного белка относительно суммарного клеточного белка.

Следующим шагом было получение «мутантного» интеина *SceVma* с заменой *Cys1* на *Ala1*. Мы предположили, что такая замена позволит полностью предотвратить или существенно снизить сплайсинг белка при сохранении способности к С-терминальному расщеплению. При культивировании штамма-продуцента *E. coli* ER2566/pERThum2 гибридный белок накапливался в растворимой форме без расщепления с высоким выходом. Однако и данная схема с использованием интеина *Ala1 SceVma* не оправдала наших ожиданий. Степень расщепления выделенного гибридного белка оказалась крайне низкой, и различные методические манипуляции (добавление тиол-содержащих соединений, повышение температуры) помогали увеличить выход реакции расщепления не более чем до 20 %.

Появление новой на тот момент экспрессионной системы IMPACT-TWIN (NEB) на основе мини-интеинов *SspDnaB*, *MthRIR1* и *MxeGytA* имело целый ряд преимуществ по сравнению с IMPACT-CN. Во-первых, это значительно меньший размер интеинов (~30 кДа), во-вторых, мутация *Cys1Ala* в мини-интеине *SspDnaB*, в отличие от *SceVma*, не влияла на отщепление С-концевого домена. При этом автокаталитическое отщепление С-концевого домена стало рН-зависимым. Плазмидой pERThum3, полученной при клонировании гена тимозина- $\alpha 1$ в вектор pTWIN1, были трансформированы клетки штамма *E. coli* ER2566 и получен штамм *E. coli* ER2566/pERThum3, продуцент гибридного белка *DnaB-T α 1*. При

ферментации этого штамма гибридный белок синтезировался в растворимой форме, но претерпевал автокаталитическое расщепление. Оптимизация условий культивирования не дала положительного результата.

Потенциальными мишенями для предотвращения преждевременного расщепления такого гибридного белка являются аминокислотные остатки, участвующие в циклизации последней аминокислоты интеина, аспарагина. И, в первую очередь предпоследняя аминокислота интеина – гистидин. Нами был проведен сайт-направленный мутагенез с его заменой на глутамин. При культивировании созданного штамма-продуцента *E.coli* ER2566/pERT_{hym4} гибридный белок также синтезировался в растворимой форме, при этом не наблюдалось продуктов автокаталитического расщепления. Поскольку степень расщепления гибридного белка на хитиновом сорбенте не превышала 50 % после 48 ч инкубации, то разработали методику его расщепления в растворе. Гибридный белок, выделенный с помощью анионообменной хроматографии, расщепляли при pH 6.0 в присутствии 2мМ MESNA. Степень расщепления составляла в этом случае не менее 98 %. Дальнейшую очистку дезацетилтимозина $\alpha 1$ проводили с помощью тангенциальной ультрафильтрации и ОФ ВЭЖХ. Выход целевого продукта в форме лиофилизата составил не менее 11 мг с литра клеточной культуры.

Таким образом, созданная генно-инженерная конструкция, содержащая модифицированный мини-интеин *SspDnaB* с мутацией в предпоследнем положении His на Gln оказалась наиболее эффективной для получения дезацетилтимозина- $\alpha 1$ за счет контроля тиол- и pH-зависимой циклизации аспарагинового остатка. Таким образом, была реализована концепция белкового сплайсинга в биотехнологическом получении пептидов с N-концевым сериновым остатком.

2. Разработка интеин-опосредованных биотехнологий получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов

Несмотря на использование интеин-опосредованных систем для получения рекомбинантных белков или полипептидов в лабораторных масштабах, их применение в биотехнологическом производстве ранее не было описано. Для внедрения этой технологии на производственную платформу получения фармацевтических препаратов остро стояла необходимость масштабирования, оптимизации и валидации всех сопряженных со стадией расщепления процессов для каждого конкретного белкового продукта. В результате был разработан ряд опытно-промышленных и промышленных биотехнологий.

В настоящей работе описано создание интеин-опосредованных биотехнологий получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов: глюкагона, окситоцина, фрагмента эндостатина, оксинтомодулина, эпидермального фактора роста, модифицированного фрагмента фактора дифференцировки пигментного эпителия, аналогов гирудина из *Hirudo medicinalis*, анальгетических пептидов – Analgesic peptide 3 из морской анемоны *Heteractis crispa* (АРНС-3) и пуротоксина-1 из яда паука *Alopecosa marikovsky* (РТ-1). На приведенных ниже примерах показано внедрение интеиновой технологии в практический биотехнологический процесс.

2.1. Разработка биотехнологии получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантного глюкагона человека – основного компонента лекарственного средства «Глюкоран»

Глюкагон - гормон, участвующий в углеводном и липидном обмене и представляющий собой 29-членный пептид, синтезируемый в альфа-клетках островков Лангерганса (Рис. 4). Глюкагон обеспечивает надежный контроль постоянного уровня глюкозы, являясь одним из антагонистов инсулина. В

качестве лекарственного средства глюкагон применяется при тяжелых гипогликемических состояниях и гипогликемической коме, возникающих у больных сахарным диабетом после инъекции инсулина или приема пероральных сахаропонижающих препаратов, в качестве «скорой помощи» в случае тяжелой гипогликемии, при интоксикации бета-адреноблокаторами и антагонистами кальция. Глюкагон применяется также с диагностической целью при рентгенологических исследованиях.

HSNGTPTSNTSKTLNSRRAQDPVQWLMNT

Рис. 4. Аминокислотная последовательность глюкагона человека.

Для получения глюкагона была выбрана конструкция на основе мини-интеина DnaB из *Synechocystis sp.*, входящая в состав экспрессионной системы IMPACT-TWIN. Разработанный нами подход получения глюкагона состоял из следующих этапов: разработка генетической конструкции, кодирующей гибридный белок DnaB-Glu, создание эффективного штамма-продуцента, разработка технологии, включающей стадии выделения, очистки и автокаталитического расщепления гибридного белка, и финишной очистки целевого пептида.

Синтетическую последовательность, кодирующую ген глюкагона человека и оптимизированную по составу кодонов для эффективной экспрессии в клетках *E.coli*, клонировали в экспрессионный вектор pTWIN1. Полученной экспрессионной плазмидой pER-G1 трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3). В результате был создан штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/pER-G1. При его культивировании не менее 30 % гибридного белка DnaB-Glu синтезировалось в нерастворимой форме в виде тел включения, а треть оставшегося растворимого гибридного белка претерпело автокаталитическое расщепление. Попытки снизить преждевременное расщепление гибридного белка добавлением в среду $ZnCl_2$ не привели к существенным изменениям. Аналитический ОФ ВЭЖХ анализ продуктов расщепления гибридного белка, выделенного из осветленного

клеточного лизата, показал, что помимо расщепления *in vivo* происходил частичный протеолиз глюкагона с С-конца. В ходе сравнительного изучения биосинтеза гибридного белка в различных штаммах-носителях *E.coli*, включающего в себя оценку уровня экспрессии, растворимость и стабильность, был выбран штамм-носитель *E.coli* ER2566 (Рис. 5). При ферментации штамма *E.coli* ER2566/pER-G1 образовывался гибридный белок в виде тел включения в количестве 150 мг белка на 1 л культуральной среды.

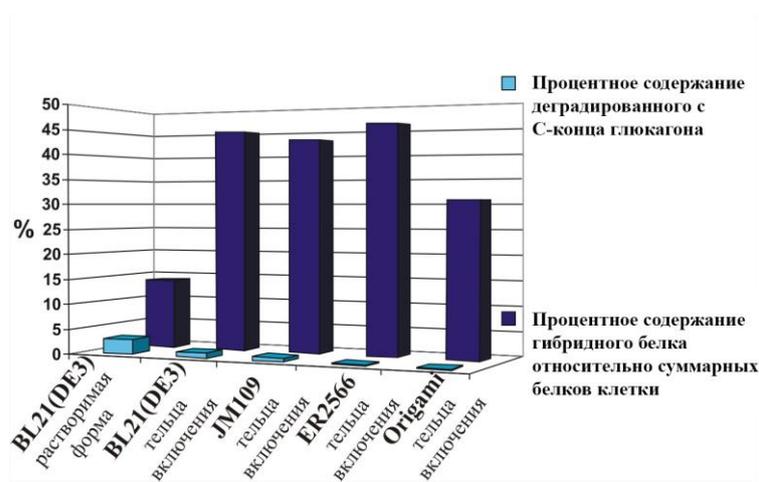


Рис. 5. Процентное содержание гибридного белка относительно суммарных белков клетки и деградированного с С-конца глюкагона в различных штаммах *E. coli*.

Первоначальная технология включала стадии солюбилизации тел включения, содержащих гибридный белок, в растворе с 6 М мочевиной при рН 10, 10-ти кратного разбавления белкового раствора и аффинной хроматографии на хитиновом сорбенте. Согласно рекомендации фирмы NEB, автокаталитическое расщепление на сорбенте индуцировали снижением рН до 6.5. Однако, доля расщепленного гибридного белка при этих условиях не превышала 70%, поскольку оптимальное значение рН для реакции автокаталитического расщепления совпадало с изоэлектрической точкой гибридного белка (рI 6.5).

Для того, чтобы контролировать рефолдинг гибридного белка и его расщепление, в дальнейшем все процессы проводили в растворе. Ренатурацию, совмещенную с автокаталитическим расщеплением, осуществляли импульсным методом разведения: порциями до концентрации суммарного белка 0.5 – 0.8 мг/мл и концентрации мочевины не более 0.6 М.

Оптимизировали данную стадию по целому ряду параметров: концентрации тиольного реагента, температуре, значению рН и длительности инкубации. Максимальный выход целевого пептида (не менее 80 % расщепления после 8 ч инкубации) наблюдался при расщеплении в буфере с рН 7.0 в присутствии 2 мМ ДТТ. Присутствие тиольного реагента приводило к значительному сокращению времени реакции и повышению эффективности расщепления.

Также были сделаны попытки по оптимизации стадии солюбилизации тел включения и экстракции гибридного белка. Увеличение рН раствора до 11.0 значительно ускоряло процесс растворения тел включения при существенно меньшей концентрации мочевины, но приводило к накоплению сульфоксид-глюкагона (продукт окисления метионина) до 40 %. В результате, остановились на солюбилизации тел включения в буфере с рН 9.0 в присутствии 6 М мочевины и 2 мМ ДТТ. При этих условиях доля образовавшегося окисленного белка составляла не более 5 %, и более 90 % гибридного белка переходило в раствор.

Масштабирование лабораторной методики до уровня опытно-промышленного регламента осуществляли на всех стадиях процесса. Ферментация штамма-продуцента *E.coli* ER2566/pER-GL в ферментере объемом 200 л позволила стабильно получать до 10 г клеточной биомассы с 1 л культуральной среды с содержанием гибридного белка не менее 23 % от общего белка клетки.

Для разрушения биомассы вместо ультразвукового дезинтегратора был использован гидродинамический дезинтегратор. Загрузка тел включения в технологический цикл составляла 100 г.

Детальное изучение кинетики реакции автолиза в большом объеме (не менее 20 л) показало, что реакция значительно замедляется примерно через 6 – 8 ч при степени расщепления около 80 % (Рис. 6). Дальнейшее увеличение продолжительности реакции до 48 часов приводило к весьма незначительному увеличению степени расщепления гибридного белка (на

4 – 5%), однако значительно увеличивало накопление сульфоксида глюкагона и продуктов деградации полипептида с С-конца. Следует отметить, что интенсивное перемешивание на этой стадии также проводило только к увеличению доли побочных продуктов и не изменяло степени автолиза.

Оптимизация условий реакции автокаталитического расщепления позволила достигнуть 90 % выхода за 6 ч, после чего реакцию останавливали подкислением до рН 3 для предотвращения деградации целевого пептида, при этом отщепленный мини-интеин *SspDnaB* (до 80 %) выпадал в осадок, а глюкагон человека оставался в растворе (Рис. 6). После завершения реакции автолиза осадок агрегировавшего гибридного белка отделяли центрифугированием.

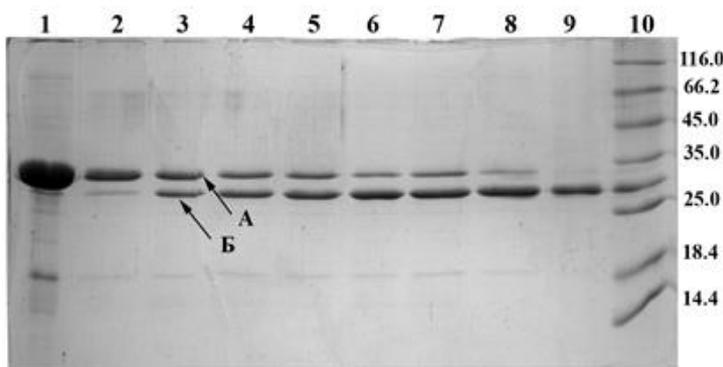


Рис. 6. Кинетика автолиза ГБ при оптимизированных условиях реакции. Электрофорез в 13%-ном ПААГ; А – гибридный белок, Б – продукт автолиза ГБ (мини-интеин *SspDnaB*).
1 – экстракт тел включения;
2 – белковый раствор до индукции расщепления;
3 – 9 – белковый раствор через 2, 3, 4, 5, 6, 8 и 16 ч автолиза соответственно;
10 – маркеры молекулярных масс

Дальнейшее выделение рекомбинантного глюкагона из реакционной смеси проводили с помощью последовательных катионообменной хроматографии, ОФ ВЭЖХ и гель-фильтрационной хроматографии. Выход одного полного технологического цикл составил не менее 1000 ± 50 мг активной фармацевтической субстанции рекомбинантного глюкагона в форме лиофилизата с хроматографической чистотой не менее 98 %.

2.2. Разработка биотехнологии получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов с антитромботической активностью – дезирудина и лепирудина

Гирудины – группа из 20 полипептидов, входящих в состав секрета слюнных желез медицинских пиявок, являющихся ингибиторами тромбина. Все природные полипептиды в этой группе обладают схожей пространственной организацией, состоят из 64 – 66 аминокислотных остатков и обладают антитромботической активностью. Многолетние структурные и биологические исследования этих полипептидов привели к созданию многочисленных модифицированных аналогов с повышенной антитромботической активностью. Ниже представлены результаты разработанной нами биотехнологии получения рекомбинантных аналогов природного гирудина-1, различающихся своей антитромботической активностью: 63-десульфатогирудина-1 (дезирудин) и [Leu¹, Thr²]-63-десульфатогирудина-1 (лепирудин), содержащего на N-конце две замены Val1Leu и Val2Thr, а также экспериментального аналога, получившего условное название гирудин 1/3, который в дальнейшем оказался менее биологически активен и в технологических разработках не использовался (Рис. 7).

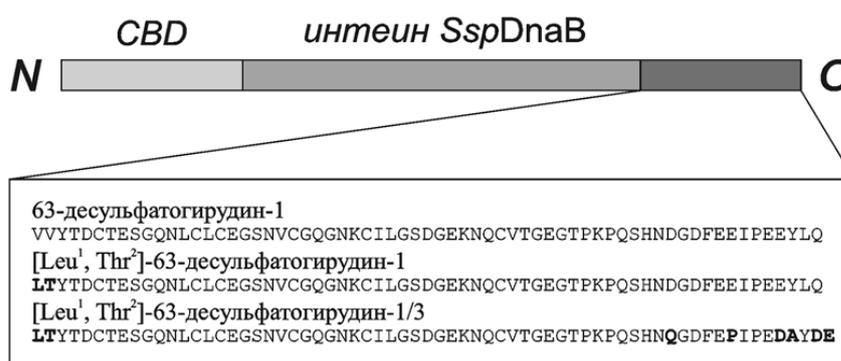


Рис. 7. Схема гибридных белков, содержащих аналоги гирудина-1. Аминокислотная последовательность рекомбинантных дезирудина, лепирудина и гирудина 1/3. Выделены аминокислотные замены в полипептидах относительно дезирудина.

Синтетические гены дезирудина, лепирудина и гирудина 1/3 были клонированы в экспрессионный вектор pTWIN1 и, таким образом, получены

плазмиды pER-HIR, pER-HIRLep и pER-HIR1/3, несущие ген гибридного белка.

Этими плазмидами были трансформированы клетки штамма-носителя *E. coli* ER2566, и полученные штаммы-продуценты *E. coli* ER2566/pER-HIR, *E. coli* ER2566/pER-HIRLep и *E. coli* ER2566/pER-HIR1/3 использовались в дальнейшей работе.

Хотя получаемые аналоги гирудина очень близки по первичной и вторичной структуре, изоэлектрической точке и гидрофобности, тем не менее разрабатываемые технологии выделения и очистки различаются. Как указано выше одна из проблем использования экспрессионных систем на основе интеинов заключается в невозможности предсказать склонность получаемого гибридного белка к самопроизвольному автокаталитическому расщеплению *in vivo*, приводящему в свою очередь к неоправданным потерям целевого продукта. Таким образом, эффективность процесса в значительной мере определяется структурой гибридного белка, а предсказать заранее результат без экспериментальных данных не представляется возможным.

На примере получения данной группы полипептидов были проиллюстрированы проблемы, возникающие при разработке интеиновых технологий (Рис. 8).



Оказалось, что образующийся после индукции гибридный белок, содержащий лепирудин, достаточно стабилен, и за 4 часа при 37 °С уровень его экспрессии достигает 32% от суммарного клеточного белка (дорожки 4 и

5 на Рис. 8). В то же время гибридный белок, содержащий дезирудин, за 3 часа инкубации при 37°C расщепляется *in vivo* почти на 80 % (Рис. 8, дорожки 2,3). Ферментация при пониженной температуре после индукции снижает этот негативный эффект до 18 % для штамма-продуцента дезирудина и не оказывает существенного влияния на биосинтез в штамме-продуценте лепирудина. При этом в экспериментальном штамме-продуценте рекомбинантного гирудина-1/3 (Рис. 8, дорожка 6,7) биосинтез гибридного белка существенно отличался от первых двух штаммов. Для штамма-продуцента гирудина-1/3 температурная зависимость ровно противоположная – пониженная температура при культивировании существенно повышает степень авторасщепления гибридного белка *in vivo*. Таким образом, культивирование штаммов-продуцентов проводили при разных температурах: *E. coli* ER2566/pER-HIRLep и ER2566/pER-HIR1/3 – при 37°C, а ER2566/pER-HIR – при 23°C.

Наработку клеточной биомассы штаммов-продуцентов дезирудина и лепирудина проводили в ферментере Electrolux (Швеция) объемом 75 л при подобранных условиях. Следует отметить, что гибридный белок, содержащий дезирудин, синтезировался в растворимой форме, а гибридный белок, содержащий лепирудин, в бактериальных клетках агрегировал в тела включения. Поэтому дальнейшие этапы получения целевых полипептидов различаются на этапах выделения гибридного белка и постановки его расщепления.

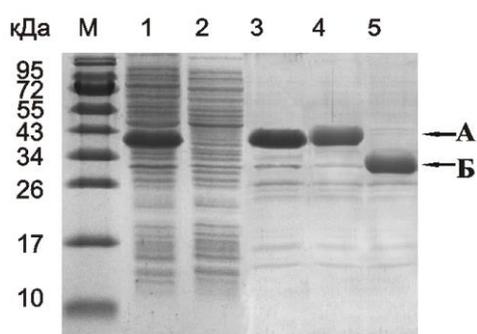


Рис. 9. Электрофоретический анализ постадийного выделения [Leu1, Thr2]-63-десульфатогирудина-1. М – маркеры молекулярной массы; **1** – клеточный лизат; **2** – супернатант клеточного лизата; **3** – тела включения; **4** – ренатурация гибридного белка; **5** – расщепление гибридного белка после 24 ч при 25°C при pH 6.0. **А** – гибридный белок, **Б** – белок-носитель (мини-интеин *SspDnaB*).

При выделении дезирудина и гирудина 1/3 требовалось проведение анионообменной хроматографической очистки гибридного белка из

осветленного клеточного лизата. А при получении лепирудина возникала необходимость солюбилизации тел включения и ренатурации экстрагированного гибридного белка (Рис. 9).

Расщепление всех гибридных белков проводили при рН 6.0 в течение 24 ч при 25 °С. Очистку всех целевые полипептидов осуществляли с помощью анионообменной хроматографии, ОФ ВЭЖХ и гель-фильтрационной хроматографии. Полученные полипептиды с хроматографической чистотой не менее 98 % лиофильно высушивали. Согласно разработанному лабораторному регламенту из 400 г влажной биомассы штамма-продуцента возможно получение 1030 мг АФС дезирудина и 1050 мг АФС лепирудина в виде лиофилизата.

2.3. Разработка биотехнологии получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантного пуротоксина 1 – основного компонента лекарственного средства «Пунальгин»

Одним из потенциальных высокоэффективных препаратов анальгетического действия является пуротоксин-1, впервые выделенный в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН из яда среднеазиатского паука-«волка» *Alopecosa marikovskiyi*. Этот пептид, состоящий из 35 аминокислотных остатков содержит 8 цистеиновых остатков, образующих «жесткий каркас» за счет внутримолекулярных S-S связей, так называемый «цистиновый узел» (Рис. 10). Пуротоксин-1 селективно ингибирует пуринергический рецептор P2X3, который рассматривается в качестве мишени при купировании болевых состояний. Учитывая весьма экзотический источник и крайне низкое содержание природного пуротоксина, для практического применения этого полипептида была разработана биотехнология получения АФС пуротоксина-1, которая является основой препарата «Пунальгин».

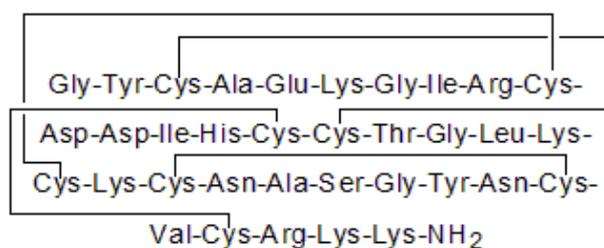


Рис. 10. Аминокислотная последовательность пуротоксина-1.

В данной работе были проведено сравнительное исследование получения пуротоксина-1 с помощью двух разных подходов с использованием сайт-специфического расщепления гибридных белков протеазами и автокаталитического при участии интеинов. Были созданы четыре генно-инженерные конструкции, содержащие в одной рамке считывания синтетический ген пуротоксина-1 с разными белками-носителями: тиоредоксином А (гибридный белок Trx-PT1), хитин-связывающим доменом (CBD-PT1), модифицированным интеином *MxeGyrA* (GyrA-PT1) и мини-интеином *SspDnaB* (DnaB-PT1) (Рис. 11).

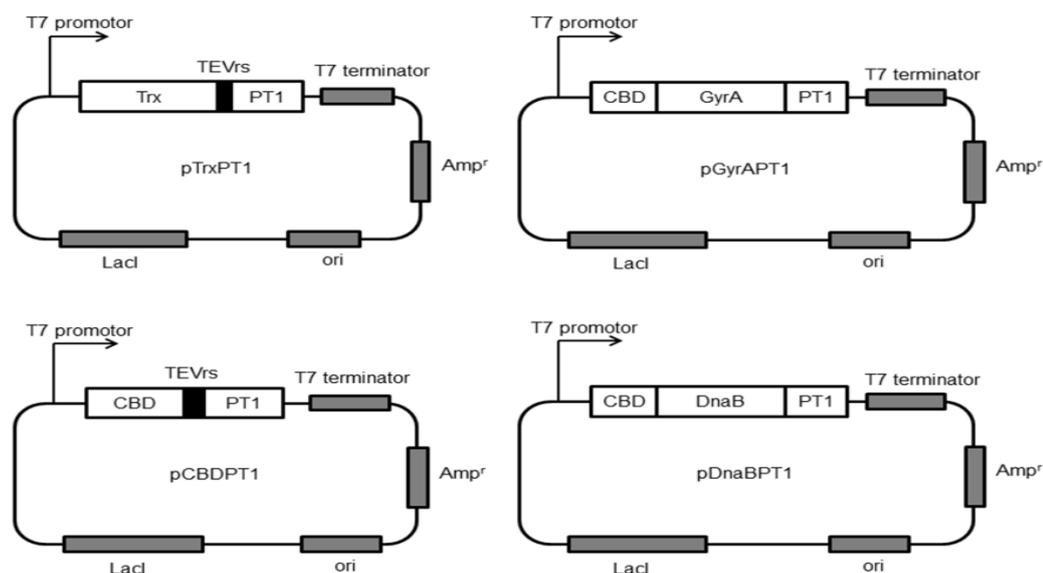


Рис. 11. Схемы экспрессионных векторов: pTrxPT1 и pCBDPT1, pGyrAPT1 и pDnaBPT1. CBD – хитин-связывающий домен, TEVrs- сайт расщепления TEV протеиназы, LacI-ген, кодирующий белок-репрессор, ori – точка начала репликации, Amp^r- ген, кодирующий бета-лактамазу, PT1 – ген, кодирующий пуротоксин-1.

В гибридных конструкциях pTrx-PT1 или pCBD-PT1 в качестве лидера использовались соответственно тиоредоксин А или последовательность хитин-связывающего домена, слитые с целевым полипептидом через сайт

узнавания протеиназы вируса гравировки табака (TEV-протеиназа). В гибридных конструкциях pGyrA-PT1 и pDnaB-PT1 использовали подход, заключающийся в получении гибридных белков, в которых белками-носителями являлись модифицированные мини-интеины *MxeGyrA* и *SspDnaB*, осуществляющие рН-зависимое автокаталитическое отщеплению целевого пептида.

Созданными экспрессионными плазмидами трансформировали клетки штамма-носителя *E.coli* C3030 и сравнивали продуктивность полученных штаммов-продуцентов и эффективность расщепления гибридных белков. При культивировании каждого штамм-продуцента гибридные белки синтезировались в растворимой форме в количестве не менее 20 % от суммарного клеточного белка. Наиболее существенным различием полученных гибридных белков оказалась различная эффективность их расщепления. Так гибридные белки, содержащие сайт узнавания TEV-протеазы (TRX-PT1 и CBD-PT1), при соотношении фермента к гибриднему белку 1:100 за 24 часа расщеплялись не более чем на 30 %. Гибридный белок, содержащий модифицированный мини-интеин *MxeGyrA* расщеплялся примерно на 15 %. В этих же условиях гибридный белок, содержащий модифицированный мини-интеин *SspDnaB*, расщеплялся почти на 90 %. Соответственно, штамм-продуцент *E. coli* C3030/pDnaBPT1 на основе мини-интеина *SspDnaB* был использован для создания промышленной биотехнологии.

Съем клеточной биомассы при ферментации штамма-продуцента *E. coli* C3030/pDnaBPT1 в 75-литровом ферментере составил не менее 15 г биомассы с 1 л культуральной среды. При этом наблюдалось значительное расщепление гибридного белка *in vivo* с образованием пуротоксина-1. Отщепленный *in vivo* полипептид благодаря своей жесткой третичной структуре обладал высокой устойчивостью к протеолизу в ходе культивирования и оставался интактным в клеточном супернатанте.

Для снижения потерь пуротоксина-1 мы отказались от классической схемы очистки, предусматривающей сорбцию и расщепление гибридного белка на хитиновом сорбенте. Поскольку целевой полипептид, отщепленный *in vivo*, получался, также, как и гибридный белок, в растворимой форме, то непосредственно после получения осветленного клеточного лизата проводили расщепление оставшегося гибридного белка в растворе при pH 6.0 в течение 16 ч при 4°C. Далее проводили очистку целевого полипептида с помощью катионообменной хроматографии, ОФ ВЭЖХ и гель-фильтрационной хроматографии. Всего за один технологический цикл из 780 г биомассы штамма-продуцента получали 857 мг активной фармацевтической субстанции пунальгина в виде лиофилизата. В сжатые сроки было наработано 6 г фармацевтически чистого рекомбинантного препарата для проведения доклинических испытаний.

2.4. Разработка биотехнологии получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантного обезболивающего полипептида АРНСЗ – основного компонента лекарственного средства «Пептальгин»

Природный обезболивающий полипептид АРНСЗ (Рис. 12), впервые выделенный в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН из морской тропической анемоны *Heteractis crispa*, проявляет высокий уровень селективности и специфичности по отношению к ванилоидному рецептору TRPV1, играющему важную роль в генерации нейрогенного воспаления и передаче болевого сигнала. Весьма экзотический источник и низкое содержание природного АРНСЗ в морской анемоне предполагает разработку биотехнологического способа получения ценного пептида. Описанный в литературе способ получения рекомбинантного АРНСЗ заключался в экспрессии рекомбинантного гена в составе гибридного белка, содержащего тиоредоксин, целевой пептид и аффинные метки. Метод разработан для лабораторного применения и требует применения дорогостоящего фермента, поэтому был радикально переработан.

GSICLEPKVVGPCSTAYFPRFYFNSETGKCTPFIYGGCEGNGNNFETLRA CTLRACRGICRA

Рис. 12. Аминокислотная последовательность АРНСЗ – анальгетического полипептида АРНСЗ из *Heteractis crispa*.

Синтетический ген пептида АРНСЗ был клонирован в экспрессионный вектор рTWIN1. Полученной рекомбинантной плазмидой рER-АРНСЗ, содержащей ген гибридного белка из мини-интеина DnaB и целевого пептида, трансформировали клетки *E. coli* С3030 и, таким образом, был создан штамм-продуцент *E. coli* С3030/рER-АРНСЗ. При культивировании штамма-продуцента гибридный белок синтезируется в нерастворимой форме, агрегируя в тела включения. После дезинтеграции биомассы тела включения, содержащие гибридный белок, солюбилизировали, полученный раствор разбавляли буфером для ренатурации при рН 9.0 и инкубировали при 25 °С в течение 24 ч. После чего снижали рН до 7.2 и проводили автолиз в течение 72 ч при 25 °С. После оптимизации условий доля расщепленного гибридного белка достигала 80 % с долей ренатурированного полипептида не менее 98 %.

Последующее выделение АРНС-3 проводили с помощью анионообменной хроматографии, ОФ ВЭЖХ и гель-фильтрационной хроматографии. получали полипептид с хроматографической чистотой не менее 98 %. Согласно разработанному технологическому регламенту из 400 г биомассы штамма-продуцента было получено 1210 мг активной фармацевтической субстанции рекомбинантного АРНС-3 в виде лиофилизированного порошка.

2.5. Разработка биотехнологии получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантного модифицированного фрагмента фактора дифференцировки пигментного эпителия человека – основного компонента лекарственного средства «Пигастин»

Фактор дифференцировки пигментного эпителия (pigment epithelium-derived factor, PEDF) – гликопротеин (MW 50 кДа), секретируемый клетками

пигментного эпителия. PEDF относится к группе ингибиторов сериновых протеаз и является эффективным эндогенным ингибитором ангиогенеза, препятствуя миграции эндотелиальных клеток, блокируя патологический рост сосудов за счет снижения экспрессии VEGF, ключевого проангиогенного фактора. Ранее нами было показано, что [44 – 77] фрагмент PEDF, содержащий на С-конце дополнительную стабилизирующую последовательность ProGlyPro (Рис. 13), обладает всем спектром антиангиогенных эффектов полноразмерного гликопротеина: блокирует миграцию и индуцирует апоптоз эндотелиальных клеток, подавляет патологическую неоваскуляризацию сосудистой оболочки глаза и роговицы. Поэтому для медико-биологических исследований и для возможного практического применения именно этот фрагмент представляет особый интерес. Ниже представлены результаты разработанной биотехнологии получения модифицированного рекомбинантного [44 – 77] фрагмента PEDF, который получил название пигастин.

DPFFKVPVNKLA~~AAV~~SNFGYDYRVRSSMSPTTNPGR

Рис. 13. Аминокислотная последовательность рекомбинантного фрагмента PEDF (пигастина). Подчеркиванием выделена последовательность ProGlyPro.

Синтетический ген, кодирующий полипептид пигастин, был клонирован в экспрессионный вектор pTwin1. Полученной плазмидой pERID-PGS трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3). В ходе культивирования гибридный белок DnaB-PGS агрегировал в виде тел включения. В связи с тем, что изоэлектрическая точка белка составляла pI 7.39, мы столкнулись с рядом трудностей при постановке расщепления (при переходе от pH 8.0 к 6.5).

Для кардинального решения этой задачи нами был создан вектор pERIG в котором в качестве белка-носителя использован мини-интеин *MxeGyrA*. В ходе ферментации штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pERIG-PGS гибридный белок агрегировал с образованием тел включения, а автокаталитическое расщепление *in vivo* не превышало 5%

(Рис 14). После ультразвуковой дезинтеграции биомассы и отмывки тела включения, содержащие гибридный белок, солюбилизировали при рН 8 в буферном растворе, содержащем 8М мочевины. Для ренатурации гибридного белка полученный белковый раствор был разбавлен в 20 раз и инкубировали в течение 2 ч. Автокаталитическое расщепление индуцировали изменением рН с 8.0 до 6.5 и инкубировали в течение 16 ч при комнатной температуре. Степень расщепления гибридного белка при этом достигала не менее 70% (Рис. 14, дорожка 3).

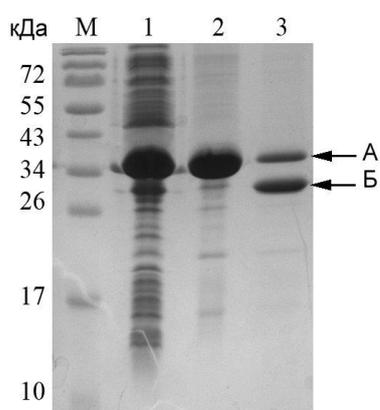


Рис. 14. Электрофоретический анализ биосинтеза и расщепления гибридного белка GyrA-PGS в денатурирующих условиях. **М** – стандарты молекулярных масс; **1** – тотальный клеточный лизат штамма-продуцента BL21(DE3)/pERIG-PGS; **2** – экстракт тел включения; **3** – расщепление гибридного белка. **А** – гибридный белок GyrA-PGS. **Б** – белок-носитель (GyrA).

После завершения стадии расщепления гибридного белка целевой полипептид выделяли с помощью последовательных анионообменной хроматографии, ОФ ВЭЖХ и гель-фильтрационной хроматографии. Из 200 г биомассы штаммы продуцента получали 690 мг АФС пигастина в виде лиофилизата с практическим выходом около 50 %.

2.6. Разработка биотехнологии получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантного оксинтомодулина

Оксинтомодулин – это 37-членный пептидный гормон, образующийся в результате процессинга препроглюкагона в кишечнике и мозге после еды (Рис 15). Его уникальная биологическая активность – подавление усвоения пищи и существенное снижение аппетита – делает это пептид весьма интересным для медицинского применения. Однако низкое содержание этого полипептида в природных источниках делают его выделение из животного сырья абсолютно нерентабельным. Поэтому нами была разработана

биотехнология интеин-опосредованного получения рекомбинантного оксинтомодулина.

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRKNKNNIA

Рис. 15. Аминокислотная последовательность оксинтомодулина.

Синтетический ген, кодирующий оксинтомодулин, был клонирован в экспрессионный вектор pTWIN1 и полученная плазмида pER-Охт была использована для трансформации клеток штамма *E.coli* ER2566. После оптимизации условий культивирования штамма-продуцента была проведена ферментация в 200 л ферментере со съемом влажной биомассы в количестве 3.2 кг. Содержание гибридного белка в биомассе составляло не менее 30 % от суммарного клеточного белка. Гибридный белок, состоящий из мини-интеина *Ssp DnaB* и оксинтомодулина, образующийся в процессе культивирования агрегировал с образованием тел включения. Поэтому после разрушения клеток тела включения, содержащие гибридный белок, отделяли центрифугированием и солюбилизировали в буферном растворе, содержащем 8 М мочевины. После 20-ти кратного разведения в буфере для ренатурации с рН 9.0, содержащем 0.4 М мочевины и 10 % глицерин, полученный белковый раствор инкубировали в течение 16 ч при +4°C.

Далее оценивали эффективность реакции автокаталитического расщепления гибридного белка по двум параметрам: времени инкубации (до 48 ч) и рН (от 6.0 до 7.5 с шагом 0.5 единиц). Было показано, что оптимальными условиями расщепления является инкубация в течение 16 ч при рН 6.5, в ходе которой не менее 80 % гибридного белка расщеплялось. Увеличение длительности инкубации приводило к частичной деградации отщепленного оксинтомодулина. Для предотвращения деградации рН реакционной смеси через 16 часов после начала расщепления снижали рН до 4.0. Выделение целевого полипептида проводили с помощью последовательных катионообменной хроматографии, ОФ ВЭЖХ и гель-фильтрационной хроматографии.

Согласно разработанному технологическому регламенту в 200 л ферментере за 1 цикл получается 3.2 кг влажной биомассы штамма-продуцента с содержанием гибридного белка около 30 % от суммарного клеточного белка. Из 300 г биомассы за один технологический цикл получали 1.0 г АФС рекомбинантного оксинтомодулина с практическим выходом не менее 40 %.

2.7. Биотехнология получения тимозина $\alpha 1$ и тимозина $\beta 4$

Тимозин $\alpha 1$ и тимозин $\beta 4$, выделенные впервые более 50 лет назад из тимуса, являются тимическими пептидными гормонами. Тимозин- $\alpha 1$ (Ta1), представляющий собой сравнительно короткий полипептид (28 а.о.), осуществляет модуляцию иммунной системы и стимулирует дифференциацию и активацию Т-клеток. Тимозин $\beta 4$ – пептид, состоящий из 43 а.о. и ответственный за регуляцию полимеризации глобулярного актина. Опосредованно тимозин $\beta 4$ регулирует клеточную миграцию, наиболее выраженную при ангиогенезе и регенерации повреждённых тканей. Также за счет уникальных кардиопротекторных свойств тимозин $\beta 4$ является стимулятором ангиогенеза в условиях ишемии сердечной мышцы, а также блокатором проапоптотических каскадов в кардиомиоцитах. Оба природных полипептида ацетилированы по N-концевому остатку серина, что повышает их устойчивость к действию протеаз (Рис. 16).

А. **Ac-SDAAVDTSSEITTKDLKEKKEVVEEAEN**

Б. **Ac-SDKPDMAEIEIKFDKSKLKKKTETQEKNP LPSKETIEQEKQAGES**

Рис. 16. Структура природных полипептидных тимических гормонов тимозина $\alpha 1$ (А) и тимозина $\beta 4$ (Б).

Разработанная биотехнология получения рекомбинантных тимозина $\alpha 1$ и тимозина $\beta 4$ заключалась в создании штаммов-продуцентов соответствующих дезацетилированных пептидов, их выделении и очистке, а затем химическом ацетилировании с последующей очисткой конечного продукта.

Генетические конструкции, содержащие последовательности, кодирующие гибридные белки, создавались под классическую технологическую схему с использованием TEV-протеазы. С этой целью нами был создан экспрессионный вектор pTEV на основе векторов pET32b(+) и pTWIN1 для клонирования гена целевого полипептида под сайт узнавания TEV-протеиназы. Гены, кодирующие тимозины $\alpha 1$ и $\beta 4$, были синтезированы химико-ферментативным способом и клонированы в этот новый вектор. Полученными экспрессионными векторами был трансформирован штамм *E. coli* ER2566 и, таким образом, получены штамм ER2566/pTEV-Thym – продуцент гибридного белка, содержащего последовательность тимозин- $\alpha 1$, и ER2566/pTEV-TB4 – продуцент гибридного белка, содержащего тимозин $\beta 4$.

В целом, принципиальных различий в получении дезацетилтимозина $\alpha 1$ и дезацетилтимозина $\beta 4$ практически нет, поэтому технологические подробности будут рассмотрены на примере получения дезацетилтимозина $\beta 4$. При масштабировании культивирования штамма-продуцента в оптимизированных условиях от качалочных колбы до промышленного ферментера съем клеточной биомассы был увеличен до 16 г с литра культуральной среды. При этом содержание гибридного белка, находящегося в растворимой форме, составило более 40 % от суммарного клеточного белка клетки. Поскольку тиоредоксин А является термостабильным белком, то для удаления балластных белков в технологию выделения ввели стадию термической обработки клеточного супернатанта. При этом было достигнуто значительное обогащение супернатанта по целевому белку при инкубации при 45 – 50 °С из-за агрегации более 2/3 всех балластных белков. При этом потери гибридного белка составили не более 10 %.

Выделение гибридного белка из супернатанта проводили с помощью анионообменной хроматографии. Расщепление гибридного белка специфической TEV протеиназой проводили при соотношении

белок : фермент 100:1, подобранном в серии экспериментов по оптимизации условий расщепления. Выделение целевого полипептида после расщепления гибридных белков проводили с помощью катионообменной хроматографии, ОФ ВЭЖХ и гель-фильтрационной хроматографии.

Полученный дезацетилтимозин $\beta 4$ является промежуточным продуктом и может быть либо ацетилирован с получением собственно тимозина $\beta 4$, либо использован в качестве исходного соединения для получения его производных с модификацией по N-концевому остатку серина, обладающих повышенной устойчивостью к действию протеаз.

Основные технологические потери при получении тимозина $\beta 4$ (как и тимозина $\alpha 1$) происходили на стадии химического ацетилирования (практический выход не превышал 50 %). При масштабировании процесса стадия ацетилирования становится лимитирующей в достижении высокого выхода конечного продукта. Исследование кинетики реакции ацетилирования показало, что при достижении 50 % конверсии в реакционной смеси значительно увеличивается доля побочных продуктов реакции (Рис. 17).

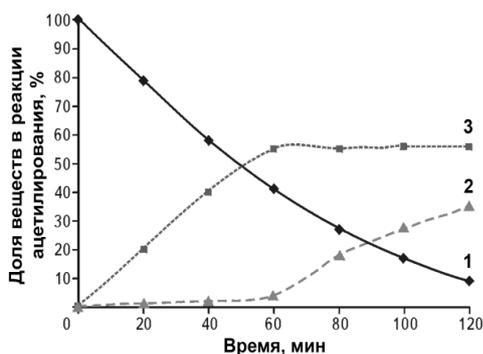


Рис. 17. Кинетика реакции ацетилирования дезацетилтимозина $\beta 4$ в лабораторных условиях. **1** – содержание дезацетилтимозина $\beta 4$; **2** – содержание побочных продуктов; **3** – содержание тимозина $\beta 4$.

Содержание побочных продуктов возрастало с увеличением продолжительности реакции без существенного изменения выхода целевого продукта. Масштабирование процесса примерно в 20-30 раз еще больше осложнило ситуацию из-за увеличения продолжительности стадии хроматографического разделения. Поэтому был разработан вариант «остановки» ацетилирования после достижения максимального выхода с

помощью лимонной или малоновой кислоты. Лимонная кислота в концентрации 10 мМ оказалась наиболее эффективным терминатором.

Очистку целевого тимозина $\beta 4$ проводили с помощью ОФ ВЭЖХ и гель-фильтрационной хроматографии. Следует отметить, что выход конечного продукта был увеличен с помощью рецикла непрореагировавшего дезацетилтимозина $\beta 4$ (desAcT $\beta 4$).

Таким образом, в ходе оптимизации технологии практический выход был увеличен с 3 до 5 мг дезацетилированного целевого пептида с 1 г биомассы. В результате масштабирования стадии культивирования на промышленном ферментере и оптимизации технологии химического ацетилирования с учетом 2 рециклов суммарный выход увеличился с 20 до 80 мг рекомбинантного тимозина $\beta 4$ с 1 л культуральной среды.

2.8. Разработка биотехнологии получения рекомбинантных тимозина $\alpha 1$ и тимозина $\beta 4$ с ацетилированием *in vivo*

Вышеописанная биотехнология получения рекомбинантных тимозина $\alpha 1$ и $\beta 4$ предусматривала получение неацетилированных полипептидов из белков-предшественников с последующим их химическим ацетилированием. В этом случае промежуточный дезацетилированный продукт может быть использован для получения аналогов с другими модификациями.

В качестве альтернативы химическому ацетилированию тимозинов, которое проходит с недостаточно высоким выходом, нами была предложена и реализована биотехнология их получения с ацетилированием рекомбинантного предшественника *in vivo* (Рис. 18).

Мы использовали ферментативный способ, представляющий собой ацетилирование белка с помощью ацетилтрансферазы и ацетилкоэнзима А в качестве субстрата. Ввиду высокой стоимости ацетилкоэнзима А ферментативное ацетилирование *in vitro* становится абсолютно нерентабельным с точки зрения производства. Напротив, ацетилирование *in*

in vivo, когда в качестве субстрата для фермента используется ацетилкоэнзим А самой клетки, является коммерчески выгодным.

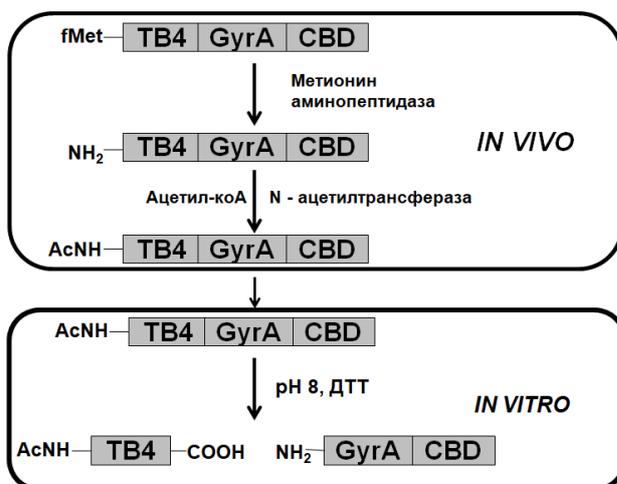


Рис 18. Схема биотехнологического получения рекомбинантного Тβ4 с ацетилированием *in vivo*.

Технологические схемы получения тимозина α1 и β4 очень близки и принципиальных различий не имеют, поэтому ниже будет представлена биотехнология получения только тимозина β4.

Для создания экспрессионной системы, обеспечивающей одновременный синтез гибридного белка и N-ацетилтрансферазы, в единую полицистронную конструкцию были клонированы последовательности тимозина бета 4 и N-ацетилтрансферазы (Рис. 19).

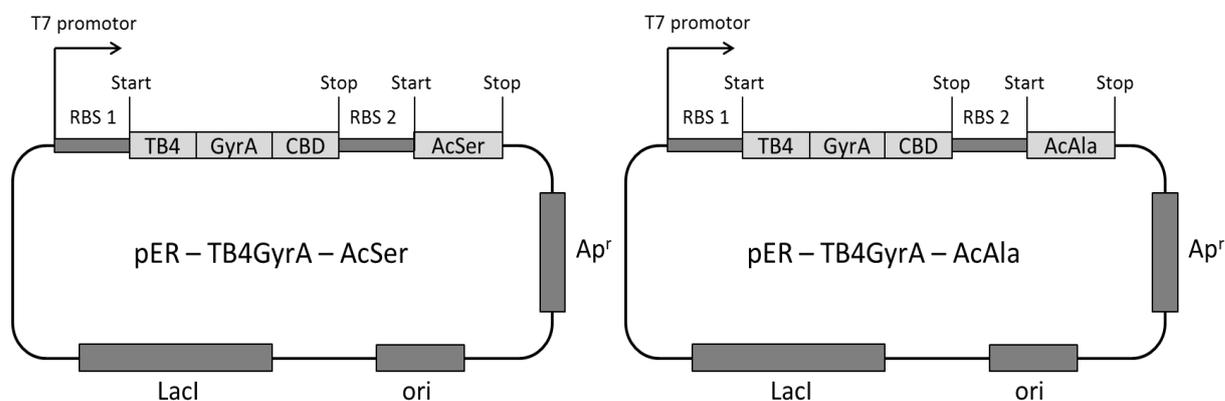


Рис. 19. Схема экспрессионных плазмид pER-Tb4GyrA-AcAla и pER-Tb4GyrA-AcSer. TB4 – ген тимозина бета 4, GyrA – ген интеина, CBD – ген хитин-связывающего домена, RBS 1 – классическая последовательность Шайна-Дальгарно, RBS 2– изменённая последовательность Шайна-Дальгарно, AcSer – ген RimJ, кодирующий сериновую N-ацетилтрансферазу *E.coli*, AcAla – ген RimL, кодирующий аланиновую N-ацетилтрансферазу *E.coli*.

В качестве ацетилирующих ферментов были выбраны аланиновая N-ацетилтрансфераза (RimJ) и сериновая N-ацетилтрансферазу (RimL) из

E. coli. В качестве экспрессионной системы использовался вектор pTWIN1, в который клонировали олигонуклеотидный дуплекс, содержащий измененную последовательность Шайна–Дальгарно (AGGAGAATAACTAG). Для ослабления связывания РНК с рибосомой и, в конечном итоге, для снижения уровня экспрессии второго гена в полицистронной конструкции, была осуществлена замена двух оснований АТ на ТА в «классической» последовательности Шайна–Дальгарно (AGGAGAAATACTAG) (Рис. 19). Сконструированными рекомбинантными плазмидами pER–Tb4GyrA–AcAla и pER–Tb4GyrA–AcSer были трансформированы штаммы *E. coli* ER2566 и C3030.

Для проверки экспрессии генов анализировали продукты белкового биосинтеза при выращивании штаммов–продуцентов в одинаковых условиях. Во всех штаммах–продуцентах происходило накопление в растворимой форме гибридного белка Tb4GyrA без расщепления *in vivo* и сериновой или аланиновой ацетилтрансфераз. В целом, продукция гибридного белка Tb4GyrA у всех штаммов была близкой – примерно 23 % от общего клеточного белка, уровень продукции ацетилтрансфераз так же был примерно одинаков и составлял около 8 %. Одним из основных критериев оценки эффективности штамма–продуцента являлась доля ацетилированной *in vivo* формы полипептида по отношению к неацетилированному предшественнику. Второй по важности критерий – это удаление N-концевого формилметионина *in vivo*. При анализе штаммов–продуцентов мы подтвердили, что в процессе посттрансляционной модификации независимо от условий культивирования штаммов–продуцентов происходило полное удаление N-концевого формилметионина. Наиболее эффективным оказался штамм на основе *E. coli* C3030, в котором при оптимальных условиях выход ацетилированного полипептида достигал 93 % (Рис. 20).

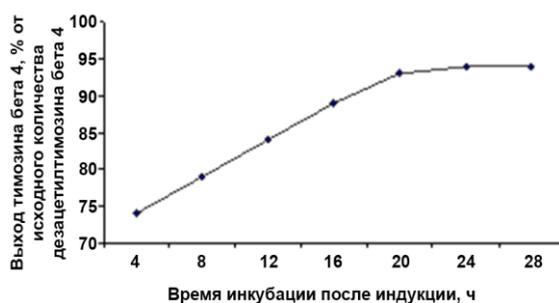


Рис. 20. Накопление ацетил-тимозина $\beta 4$ при культивировании штамма-продуцента *E. coli* C3030/pER-Tb4GyrA-AcSer при 37°C.

Выделение целевого продукта осуществляли с помощью катионообменной хроматографии, ОФ ВЭЖХ и гель-фильтрационной хроматографии. Конечный выход целевого продукта составил не менее 20 мг тимозина $\beta 4$ с 1 л культуральной среды.

3. Получение модифицированных рекомбинантных полипептидов с улучшенными фармакологическими свойствами

Природные полипептиды оксинтомодулин и тимозин $\beta 4$ в организме млекопитающих быстро метаболизируются за счет протеолитических ферментов. Поэтому увеличение времени полужизни этих соединений *in vivo* способствует увеличению длительности терапевтического воздействия, т.е. улучшает фармакодинамические свойства препарата. Путем ковалентной модификации рекомбинантных полипептидов низкомолекулярными и высокомолекулярными агентами или создания комплексов с биополимерами достигают повышения стабильности готовых лекарственных форм.

Полисиаловая кислота – природный линейный гомополимер, входящий в состав нейрональной молекулы клеточной адгезии (PSA-NCAM) и участвующий в формировании межклеточных связей. Также полисиаловая кислота является компонентом клеточной стенки некоторых бактерий. Бутиральальдегидное производное полисиаловой кислоты, фракция 14 кДа (Liproxen Facilities, Англия) была получена от компании «Фармсинтез» в рамках совместной работы по разработке и проведению доклинических испытаний лекарственного средства «Оксинтолонг» (Рис. 21).

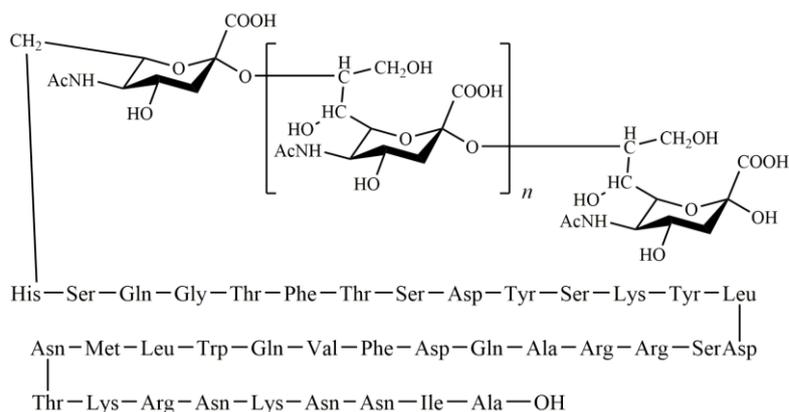


Рис. 21. Схематическое изображение структуры оксинтомодулина, модифицированного полисиаловой кислотой. $n=40-50$.

Мы провели исследования по увеличению стабильности полученных нами рекомбинантных полипептидов после их модификации полисиаловой кислотой. Важным условием проведения модификаций является сохранение полипептидами их биологической активности, которая делает их столь привлекательными для практического использования в медицине. Наша разработка касалась модификации оксинтомодулина (коммерческое название «Оксинтолонг») и тимозина $\beta 4$. Ниже представлена модификации на примере тимозина $\beta 4$.

Для получения полисилированного производного тимозина $\beta 4$ по N-концевому сериновому остатку была использовано активированное линейное бутиральдегидное производное полисиаловой кислоты (ПСК-14). Модификация протекает в две стадии. Сначала к N-концевому сериновому остатку присоединяется бутиральдегидное производное полисиаловой кислоты с образованием нестабильного основания Шиффа. Этот продукт на второй стадии восстанавливается цианборгидридом натрия с образованием стабильного конъюгата. Оптимизируя условия проведения первой стадии (температура, время, pH, соотношение ПСК/полипептид, содержание ацетонитрила в растворе), удалось добиться за 3 ч 60 % выхода модифицированного полипептида. Было проведено пептидное картирование модифицированного полипептида, выделенного с помощью препаративной обратно-фазовой ВЭЖХ, с помощью хромато-масс-спектрометрического анализа протеолитической смеси. Было подтверждено наличие ПСК-группы

на N-конце полипептида. Изучение сравнительной стабильности в сыворотке крови кролика показало, что в аналогичных условиях время полужизни полипептидов для природного тимозина β_4 составляло 2 часа, а для ПСК-модифицированного полипептида – 6 часов.

Аналогичная работа была проделана по получению модифицированного оксинтомодулина – оксинтолонга. Оптимальные условия для синтеза препарата: концентрация оксинтомодулина 1 - 1,5 мг/мл; буфер с рН 4.5; 30% ацетонитрила; 4-5 мг/мл NaCNBH_3 ; мольное соотношение ПСА:оксинтомодулин = 2÷3:1; температура 25-30 °С; время реакции 3 часа. С полученным моносиалированным производным оксинтомодулина были проведены все необходимые доклинические испытания. В настоящее время получено разрешение Минздрава России на проведение клинических исследований лекарственного препарата «Оксинтолонг, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения, 50 мг».

4. Получение готовых лекарственных форм

Активные фармацевтические субстанции, по сути, являются промежуточными продуктами (полуфабрикатами) и используются для приготовления лекарственных форм. Так как основной способ применения лекарственных средств на основе полипептидов – инъекционный, нами были разработаны технологии получения готовых лекарственных форм в виде лиофилизата для приготовления раствора для инъекций.

В состав лекарственной формы помимо фармацевтической субстанции входят дополнительные компоненты, способствующие улучшению фармакологических параметров и/или длительному хранению препарата. Были разработаны технологии готовых лекарственных форм препаратов «Глюкоран» и «Оксинтолонг». В качестве примера ниже приведено получение готовой лекарственной формы рекомбинантного глюкагона –

«Глюкоран, глюкагон рекомбинантный, человеческий генноинженерный, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 1 МЕ»

Получение препарата «Глюкоран» помимо приготовления фармацевтической композиции рекомбинантного глюкагона включает ее стерилизацию фильтрацией, розлив (расфасовка) по флаконам и лиофильное высушивание в асептических условиях, последующие укупорку, завальцовку и маркировку флаконов с ГЛФ и окончательную упаковку продукта. Поскольку приготовление ГЛФ требовало поддержания асептических условий, то все стадии проводились в условиях Цеха готовой лекарственной продукции ОБП ИБХ РАН.

В состав фармацевтической композиции входят:

- 1 мг фармацевтической субстанции рекомбинантного глюкагона (соответствует 1 МЕ)
- 107 мг лактозы моногидрата

Проведенные испытания биологической активности «Глюкоран» показали, что подобранные условия технологического процесса и состав фармацевтической композиции обеспечивают сохранность биологической активности рекомбинантного глюкагона в течение заявленного срока хранения (1 год).

5. Методы технологического контроля и анализа конечного продукта

Разработка биотехнологии получения фармацевтических субстанций всегда содержит аналитическую составляющую – методы технологического контроля и анализа продукции. В аналитической части работы мы выделили три составляющих: методы, использующиеся при разработке технологии (исследовательская часть), методы текущего технологического контроля, обеспечивающие наблюдение за ключевыми стадиями процесса, и методы анализа конечного продукта. Анализ каждого конечного продукта подробно описан в разработанных нами соответствующих фармацевтических статьях.

5.1. Аналитические методы, используемые при разработке биотехнологий

Аналитические методы, использованные в настоящем исследовании при разработке биотехнологий, являются традиционными методами молекулярной биологии, которые применяются для характеристики белков и пептидов: электрофорез в ПААГ и аналитическая ВЭЖХ. В отдельных случаях для характеристики получаемого продукта и доказательства его структуры (например, идентификации окисленного глюкагона или картировании модификации пептидов ПСК) использовалась хромато-масс-спектрометрия. Следует отметить, что разработанные нами аналитические методы были направлены на:

- полную характеристику полученных препаратов, включая подтверждение соответствия свойств заданным или предполагаемым параметрам, создание внутренних стандартов и сравнение с доступными фармакопейными эталонами;
- подтверждение воспроизводимости на всех стадиях технологического процесса.

При определении содержания гибридных белков в штаммах-продуцентах, при оптимизации условий расщепления гибридных белков, при анализе фракций после хроматографической очистки на разных стадиях получения препаратов основным методом контроля процессов являлся электрофоретический анализ в ДСН-ПААГ с последующей денситометрической оценкой. Примеры использования электрофореза в разработке биотехнологий и технологического процесса приведены на Рис. 2, 6, 8, 9, 10 и 14. Для количественной оценки чистоты белковых препаратов на разных стадиях выделения использовали два варианта окрашивания ПААГ с помощью кумасси R250 и нитрата серебра, обладающих разной чувствительностью.

В качестве второго количественного метода анализа была использована аналитическая ОФ ВЭЖХ. Метод позволяет точно определить чистоту и

содержание препарата и примесей на разных технологических стадиях. В разработанных технологических процессах химического ацелирования тимозина $\alpha 1$ и $\beta 4$ аналитическая ОФ ВЭЖХ, совмещенная с хромато-масс-спектрометрией, являлась основным методом контроля.

Масс-спектрометрия активно использовалась при разработке биотехнологий для идентификации родственных соединений и посторонних примесей. Важную роль сыграл этот метод при определении положения ацетильной группы в молекулах тимозинов, идентификации модифицированных форм (окисленные, карбомоилированные и деамидированные производные, продукты деградации белка), продуктов неправильного рефолдинга. Пептидное картирование в сочетании с хромато-масс-спектрометрией позволило однозначно идентифицировать все модификации рекомбинантных полипептидов. В самом технологическом цикле ни для характеристики промежуточных продуктов, ни для характеристики конечной фармацевтической субстанции масс-спектрометрический анализ не требуется.

5.2. Аналитические методы контроля технологического процесса

Для всех технологических процессов нами были разработаны методы контроля, являющиеся составной частью технологических регламентов и обеспечивающие воспроизводимость процессов в рамках заданных параметров. Так при ферментации штаммов-продуцентов были подготовлены маршрутные карты для контроля основных параметров процесса: рН среды, температуры, скорости перемешивания, насыщения кислородом, скорости роста культуры (по оптической плотности). Электрофоретический анализ в ПААГ является основным методом для контроля результатов ферментации, стадии разрушения биомассы, анализа фракций после хроматографической очистки гибридного белка. После стадии расщепления гибридного белка и при очистке целевых полипептидов основным методом контроля является аналитическая ОФ ВЭЖХ.

5.3. Методы контроля конечного продукта

Методы контроля качества активной фармацевтической субстанции рекомбинантных полипептидов были разработаны коллективом лаборатории биотехнологии совместно с Контрольно-аналитической лабораторией ОБП ИБХ РАН и отражены в фармакопейных статьях предприятия (ФСП). Нарботка и сертификация опытных серий АФС и ЛС проводилась в соответствии с опытно-промышленным регламентом в условиях опытно-промышленной установки ИБХ РАН по всем параметрам, прописанным в ФСП. Для всех созданных фармацевтических субстанций были разработаны и утверждены фармацевтические стандарты предприятия для стандартизации анализа конечного продукта и оценки стабильности качества получаемых АФС. Нормы по показателям для генноинженерных фармацевтических субстанций, таким как содержание иммунореактивных белков *E.coli* и остаточной ДНК штамма-продуцента и микробиологическая чистота, установлены на уровне, предъявляемым к аналогичным препаратам в международной практике. Последняя характеристика – биологическая активность – является уникальной для каждого вида фармацевтической субстанции и определяется специфическим тестом, разработанным специально для каждого рекомбинантного полипептида с учетом его биологической функции в организме.

5.4. Тестирование биологической активности рекомбинантных полипептидов

Разработка животных моделей и тестирование биологической активности полученных препаратов являлись составной частью всех описанных разработок. Лишь малая часть из получаемых препаратов является признанными лекарственными средствами. Для большей части необходимо было разработать или воспроизвести стандартные международные протоколы.

Условно все фармацевтические субстанции рекомбинантных полипептидов, технологии получения которых описаны в настоящей работе, можно условно разделить на две группы. В первую группу входят фармацевтические субстанции с устоявшейся практикой применения, с известным общепринятым международным стандартом. К таким продуктам относятся глюкагон («Глюкоран») и окситоцин. Тестирование биологической активности этих фармацевтических субстанций проводило в сравнении с фармакологическим действием стандартного препарата. Для глюкагона таким образцом сравнения являлся препарат «Glucagen HuroKit» (Novo Nordisk A/S). Фармацевтическая субстанция рекомбинантного глюкагона человека, полученная по разработанной в ИБХ РАН биотехнологии, также как и готовая лекарственная форма «Глюкоран» показали полную аутентичность с препаратом «Glucagen HuroKit».

К второй группе следует отнести фармацевтические субстанции рекомбинантных полипептидов, которые еще не получили окончательного признания как лекарственные средства и не имеют четких устоявшихся критериев биологической активности. К этой группе относятся: тимозины $\alpha 1$ и $\beta 4$ и их модификации, модифицированный оксинтомодулин, фрагменты пептидных ингибиторов ангиогенеза (фактора дифференцировки пигментного эпителия, тумстатина и эндостатина).

Доклинические испытания препаратов «Глюкоран», «Оксинтолонг», «Пептальгин» и «Пунальгин», тимозинов $\alpha 1$ и $\beta 4$, аналогов гирудина (дезирудин и лепирудин) и часть работ с препаратами «Пигастин» и «Тумастин» проводились в лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН под руководством Мурашева А.Н.

Модифицированный оксинтомодулин – «Оксинтолонг» – тестировали по гипогликемической активности препарата в сравнении с эксенатидом (Баета, Eli Lilly and Company) в тесте нагрузки глюкозой. Тимозин $\beta 4$ и его аналоги тестировали на лабораторных животных на способность к терапии

хронического воспалительного поражения кожи спины (хронический дерматит) и на животной модели ишемии миокарда.

Тестирование биологической активности полипептидных анальгетиков, препаратов «Пептальгин» и «Пунальгин» проводилась в сравнении с низкомолекулярными анальгетиками, т.к. пептидных аналогов этих препаратов пока не существует. Биологическую активность пептидного анальгетика «Пептальгин» определяли по снижению болевой реакции мышей в тесте «горячая пластина», а препарата «Пунальгин» – в тесте «уксусные корчи» для оценки перитовисцеральной боли при химическом раздражении брюшины.

Биологическая активность фрагментов пептидных ингибиторов ангиогенеза тестировалась на кафедре офтальмологии ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова под руководством академика В.А.Ткачука на модели неоваскуляризации роговицы кролика, модели гипероксигенационной ретиальной неоваскуляризации на глазах мышей и модели неоваскуляризации на глазах кроликов с целевой трансвитреальной доставкой (имплантацией) VEGF в субретиальное пространство и последующей лазерной ретино-хориоидальной деструкцией. Результаты проведенного доклинического исследования препарата «Пигастин» для интравитреального введения показали, что антиангиогенное действие «Пигастина» по степени выраженности было идентичным терапевтическому эффекту контрольного ЛС офтальмологического назначения – «Луцентис» (Novartis Pharma).

ВЫВОДЫ

1. На основании проведенных исследований разработаны принципы и реализованы пути создания активных фармацевтических субстанций рекомбинантных пептидов, полученных с использованием экспрессионных интеиновых систем. Полученные результаты можно рассматривать как общее методическое биотехнологическое направление при создании новых лекарственных препаратов генно-инженерного происхождения.
2. Разработаны новые векторные системы и получены высокопродуктивные бактериальные штаммы-продуценты соответствующих гибридных белков, состоящих из интеинов и целевых полипептидов. Изучены экспрессия гибридных генов и стабильность белков *in vivo*, оптимизированы условия культивирования штаммов и показана возможность их использования для производственной ферментации.
3. Созданы интеин-опосредованные биотехнологии получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов: глюкагона, аналогов гирудина, фрагмента эндостатина, оксинтомодулина, модифицированного фрагмента фактора дифференцировки пигментного эпителия, окситоцина, анальгетических полипептидов АРНС-3 и РТ-1 с использованием гибридных белков, содержащих элементы белкового сплайсинга и не требующие применения специфических протеаз. Показана возможность совмещения интеин-опосредованных стадий процесса в одном реакторе: одновременного рефолдинга интеинового домена и целевого полипептида, автокаталитического расщепления гибридного белка и осаждения балластных белков.
4. Созданы биотехнологии получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов дезацетилтимозина $\alpha 1$,

дезацетилтимозина $\beta 4$ и фрагмента тумстатина с использованием сайт-специфической TEV-протеиназы.

5. Разработаны технологии получения активных фармацевтических субстанций тимозина $\alpha 1$ и тимозина $\beta 4$ посредством химического ацетилирования, оксинтомодулина и тимозина $\beta 4$, модифицированных полисиаловой кислотой.
6. Разработана интеин-опосредованная биотехнология получения рекомбинантных тимозина $\alpha 1$ и тимозина $\beta 4$ с ацетилированием *in vivo*, исключая стадию химического ацетилирования пептида.
7. Для всех полученных рекомбинантных полипептидов на клеточных и животных моделях показана высокая специфическая биологическая активность и фармакологическая значимость.
8. На основе разработанных биотехнологических подходов созданы опытно-промышленные технологии получения активных фармацевтических субстанций следующих рекомбинантных полипептидов: тимозина $\alpha 1$, тимозина $\beta 4$, глюкагона, аналогов гирудина (лепирудин и дезирудин), оксинтомодулина (оксинтолонг), модифицированных фрагментов фактора дифференцировки пигментного эпителия (пигастин) и тумстатина (тумастин), анальгетических полипептидов – АРНС-3 (пептальгин) и РТ-1 (пунальгин). Все технологии описаны в разработанных технологических регламентах на производство соответствующих активных фармацевтических субстанций.
8. Для всех созданных технологий разработаны методы технологического контроля и анализа конечного продукта, включая тестирование биологической активности. Методы анализа конечного продукта включены в разработанные фармакопейные статьи предприятия (ФСП).
9. На основе созданных опытно-промышленных технологий получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов разработаны промышленные технологии получения готовых

лекарственных форм (ГЛФ): «Глюкоран» (глюкагон рекомбинантный человеческий генноинженерный, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 1МЕ) и «Оксинтолонг» (конъюгат генноинженерного оксинтомодулина человека и полисиаловой кислоты, фракция 14 кДа, лиофилизованный порошок для приготовления раствора для подкожного введения 50 мг).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Научные статьи:

1. **Esipov R.S.**, Makarov D.A., Stepanenko V.N., Kostromina M.A, Muravyova T.I, Andreev Y.A, Dyachenko I.A., Kozlov S.A., Grishin E.V. Pilot Production of the Recombinant Peptide Toxin of *Heteractis Crispa* as a Potential Analgesic by Intein-Mediated Technology. *Protein Expr. Purif.* 2018; 145: 71-76.
2. **Есипов Р.С.**, Степаненко В.Н., Зверева И.О., Макаров Д.А., Костромина М.А., Костромина Т.И., Муравьева Т.И., Мирошников А.И., Гришин Е.В. Биотехнологический способ получения рекомбинантного пептидного анальгетика – пуротоксина-1 из яда паука *Geolycosa sp.* *Биорг. химия.* 2018; 44(1): 38-46.
3. Макаров Д.А., **Есипов Р.С.** Разработка способов получения аналогов тимозина бета4, устойчивых к деградации в токе крови. *Биотехнология.* 2016; 2: 57-71.
4. **Esipov R.S.**, Makarov D.A., Stepanenko V.N, Miroshnikov A.I. Development of the Intein-mediated method for production of recombinant Thymosin β 4 from the acetylated *in vivo* fusion protein *Journal of Biotechnology.* 2016; 228: 73-81
5. **Esipov R.S.**, Kostromina M.A. Comparative Analysis of the Effectiveness of C-terminal Cleavage Intein-Based Constructs in Producing a Recombinant Analog of Anophelin, an Anticoagulant from *Anopheles albimanus*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2015; 175(5): 2468-2488.
6. Моисеева Е.В., Бейрахова К.А., Семушина С.Г., Аронов Д.А., Макаров Д.А., **Есипов Р.С.** Эффективность рекомбинантного тимозина β 4 в спонтанной мышинной модели хронического дерматита. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2014; 158 (11): 620-623.
7. Макаров Д.А., Муравьева Т.И., Степаненко В.Н., **Есипов Р.С.** Оптимизация и масштабирование лабораторного метода получения рекомбинантного тимозина бета 4 до пилотного производства. *Биотехнология.* 2014; 30(4): 35-44.
8. Лихванцева В.Г., Арутюнян Е.В., Мирошников А.И., Салихов А.Ю., Белоус О.В., Курцхалидзе К.Д., **Есипов Р.С.**, Бейрахова К.А., Степаненко В.Н. Изучение возможностей природных ингибиторов ангиогенеза эндостатина, тумстатина и фактора, выделяемого пигментным эпителием сетчатки (PEDF), в аваскулогенной терапии. *Офтальмология* 2013; 10 (2): 50-53.
9. **Esipov R.S.**, Stepanenko V.N., Chupova L.A., Miroshnikov A.I. Production of Recombinant Oxytocin through Sulfitolysis of Intein-containing Fusion Protein. *Protein & peptide letters.* 2012; 19 (5): 479-484.
10. **Esipov R.S.**, Beyrakhova K.A., Likhvantseva V., Stepanova E.S., Stepanenko V.N., Kostromina M.D., Abramchik Y.A., Miroshnikov A.I. Antiangiogenic and antivascular effects of a recombinant tumstatin-derived peptide in a corneal neovascularization model. *Biochimie* 2012; 94: 1368-1375.
11. Костромина М.А, **Есипов Р.С.**, Мирошников А.И. Биотехнологический способ получения рекомбинантных аналогов гирудина-1 из *Hirudo medicinalis*. *Биоорганическая химия* 2012; 38(2): 1-11.
12. Есипов Р.С., Бейрахова К.А., Чупова Л.А., Лихванцева В. Г., Степанова Е.В. , Мирошников А.И. Рекомбинантный фрагмент 44-77 фактора дифференцировки пигментного эпителия препятствует развитию патологической неоваскуляризации роговицы. *Биоорганическая химия.* 2012; 38(1): 1-8.

13. Лихванцева В.Г., Кузьмин К.А., Арутюнян Е.В., Салихов А.Ю., Андреев Ю.В., Белоус О.В., Мирошников А.И., **Есипов Р.С.**, Бейрахова К.А., Степаненко В.Н. Антиангиогенные эффекты природных ингибиторов ангиогенеза тумстатина и PEDF на экспериментальной модели васкуляризации роговицы по результатам морфологических исследований. *Офтальмохирургия* 2011; 4: 65-69.
14. Мирошников А.И., Лихванцева В.Г., Степанова Е.В., Арутюнян Е.В., **Есипов Р.С.**, Бейрахова К.А., Степаненко В.Н., Белоус О.В. Изучение *in vitro* антиангиогенной активности природных ингибиторов ангиогенеза: эндостатина, тумстатина и PEDF. *Офтальмохирургия*. 2011; 1: 76-82.
15. **Esipov R.S.**, Stepanenko V.N., Beyrakhova KA, Muravjeva T.I., Miroshnikov A.I. Production of thymosin $\alpha 1$ via non-enzymatic acetylation of the recombinant precursor. *Biotechnol Appl Biochem*. 2010; 56(1): 17-25.
16. Бейрахова К.А., Степаненко В.Н., Мирошников А.И., **Есипов Р.С.** Биотехнологический способ получения ацетилированного тимозина бета 4. *Биоорганическая химия*. 2011; 37(2): 223–232.
17. **Esipov R.S.**, Stepanenko V.N., Chupova L.A., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L., Miroshnikov A.I. Production of recombinant human epidermal growth factor using Ssp dnaB mini-intein system. *Protein Expr Purif*. 2008; 61(1): 1-6.
18. Степаненко В.Н., **Есипов Р.С.**, Гуревич А.И., Чупова Л.А., Мирошников А.И. Рекомбинантный оксинтомодулин. *Биоорганическая химия*. 2007; 33(2): 245-250.
19. **Esipov R.S.**, Stepanenko V.N., Gurevich A.I., Chupova L.A., Miroshnikov A.I. Production and purification of recombinant glucagon overexpressed as Intein fusion protein in *Escherichia coli*. *Protein&Peptide letters*, 2006; 13(4): 343-347.
20. **Есипов Р.С.**, Гуревич А.И., Степаненко В.Н., Чупова Л.А., Чувиковский Д.В., Мирошников А.И. Рекомбинантный тимозин α_1 . *Биоорганическая химия*. 2004; 30(5): 481-486.
21. **Esipov R.S.**, Chupova L.A., Shvets S.V., Chuvikovsky D.V., Gurevich A.I., Muravyova T.I., Miroshnikov A.I. Production and purification of recombinant human oxytocin overexpressed as a hybrid protein in *Escherichia coli*. *Protein and Peptide Letters*. 2003; 10(4): 404-411.
22. Гуревич А.И., **Есипов Р.С.**, Каюшин А.Л., Коростелева М.Д. Получение некоторых искусственных генов методом ПЦР на синтетической матрице. *Биоорганическая химия*. 1997; 23(6): 492-496.

Патенты:

1. **Есипов Р.С.**, Костромина М.А., Бейрахова К.А., Макаров Д.А., Мирошников А.И. Рекомбинантная плазмидная ДНК pERIG-PGS, кодирующая гибридный белок, способный к автокаталитическому расщеплению с образованием антиангиогенного пептида пигастина - производного фрагмента [44-77] фактора роста пигментного эпителия человека, штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)/pERIG-PGS - продуцент указанного белка, и способ получения рекомбинантного антиангиогенного пептида. Патент РФ № 2664199 от 06.07.2017.
2. **Есипов Р.С.**, Костромина М.А., Бейрахова К.А., Макаров Д.А., Мирошников А.И. Штамм *E. coli* BL21(DE3)/pTEV-TMS - продуцент гибридного белка T_{rx}TEV_{rs}-TMS, предназначенного для протеолитического расщепления с образованием антиангиогенного пептида тумстатина, производного фрагмента [L69K-95] тумстатина человека, и способ получения рекомбинантного антиангиогенного пептида. Патент РФ № 2625008 от 06.11.2015.

3. **Есипов Р.С.,** Степаненко В.Н., Макаров Д.А., Мирошников А.И. Рекombинантная плазмидная ДНК pER-TA1GyrA-AcSer, кодирующая сериновую ацетилтрансферазу, способную *in vivo* ацетилировать N-концевой серин дезацетилтимозина альфа-1 и гибридный белок, способный к автокаталитическому расщеплению с образованием тимозина альфа-1 человека, штамм-продуцент *Eschrichia coli* C3030/pER-TA1GyrA-AcSer продуцент указанных белков и способ получения генно-инженерного тимозина альфа-1 человека. Патент РФ № 2593172 от 05.05.2015.
4. **Есипов Р.С.,** Макаров Д.А., Степаненко В.Н., Мирошников А.И. Рекombинантная плазмидная ДНК pER-TB4GyrA-AcSer, кодирующая сериновую ацетилтрансферазу, способную *in vivo* ацетилировать N-концевой серин дезацетилтимозина бета 4 и гибридный белок, способный к автокаталитическому расщеплению с образованием тимозина бета 4 человека, штамм-продуцент *Eschrichia coli* C3030/pER-TB4GyrA-AcSer продуцент указанных белков и способ получения генно-инженерного тимозина бета 4 человека. Патент РФ № 2592860 от 05.05.2015.
5. **Есипов Р.С.,** Макаров Д.А., Степаненко В.Н., Мирошников А.И. Ковалентный моноконъюгат капроновой кислоты с тимозином бета 4, устойчивый к деградации в токе крови, и способ его получения. Патент РФ № 2604686 от 23.11.2015.
6. **Есипов Р.С.,** Макаров Д.А., Степаненко В.Н., Мирошников А.И. Способ получения моноконъюгата полисиаловой кислоты с тимозином бета 4 и ковалентный моноконъюгат полисиаловой кислоты с тимозином бета 4, устойчивый к деградации в токе крови. Патент РФ № 2605385 от 23.11.2015.
7. **Есипов Р.С.,** Макаров Д.А., Степаненко В.Н., Мирошников А.И. Ковалентный моноконъюгат полиэтиленгликоля с тимозином бета 4, устойчивый к деградации в токе крови, и способ его получения. Патент РФ № от 23.11.2015.
8. **Есипов Р.С.,** Макаров Д. А., Степаненко В. Н., Андреев Я. А., Козлов С. А., Гришин Е. В. Рекombинантная плазмидная ДНК pER-APHСЗ, кодирующая гибридный белок, способный к автокаталитическому расщеплению с образованием APHCЗ, штамм *Eschrichia coli* C3030/pER- APHCЗ продуцент указанных белков и способ получения рекombинантного APHCЗ. Патент РФ № 2619170 от 18.09.2015.
9. **Есипов Р.С.,** Степаненко В.Н., Василевский А.А., Королькова Ю.В., Гришин Е.В. Способ получения рекombинантного анальгетического пептида. Патент РФ на изобретение № 2571942 от 14.11.2013.
10. **Есипов Р.С.,** Степаненко В.Н., Бейрахова К.А., Мирошников А.И., Автушенко С.С., Сурков К.Г., Романов В.Д., Генкин Д.Д. Оксинтомодулин человека, его применение. Лекарственный препарат на его основе и способ применения препарата для лечения и профилактики гипергликемии. Патент РФ на изобретение № 2524204 от 30.11.2009.
11. **Есипов Р.С.,** Степаненко В.Н., Костромина М.А., Мирошников А.И., Воробьев А.И., Юрьев А.С. Рекombинантная плазмидная ДНК pER-Hir, кодирующая гибридный белок, способный к автокаталитическому расщеплению с образованием [Leu1, Thr2]-63-десульфатогирудина, штамм *Escherichia coli* ER2566/pER-Hir - продуцент указанного белка и способ получения генно-инженерного [Leu1, Thr2]-63-десульфатогирудина. Патент РФ на изобретение № 2435858 от 23.10.2009.
12. **Есипов Р.С.,** Степаненко В.Н., Чупова Л.А., Гуревич А.И., Мирошников А.И. Способ получения генно-инженерного эпидермального фактора роста человека, рекombинантная плазмидная ДНК pER-hEGF, кодирующая гибридный белок, способный к автокаталитическому расщеплению с образованием эпидермального

фактора человека, и штамм *Escherichia coli* ER2566/pER-hEGF продуцент указанного белка. Патент РФ № 2323976 от 30.05.2006.

13. **Есипов Р.С.**, Степаненко В.Н., Чупова Л.А., Гуревич А.И., Мирошников А.И. Способ получения генно-инженерного глюкогена человека, рекомбинантная плазмидная ДНК pER-G1, кодирующая гибридный белок, способный к автокаталитическому расщеплению с образованием глюкогена человека, и штамм *Escherichia coli* ER2566/pER-G1. Патент РФ № 2302465 от 07.09.2005.

Опубликованные тезисы конференций и доклады:

1. **Есипов Р.С.**, Костромина М.А., Макаров Д.А., Михеева О.О., Муравьева Т.И. и Мирошников А.И. Биотехнологии получения белков медицинского назначения с помощью интеин-опосредованных систем экспрессии. Материалы Объединенного научного форума Международная научная конференция "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" и VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды" (Москва 18-22 сентября 2017).
2. **Есипов Р.С.**, Костромина М.А., Бейрахова К.А., Макаров Д.А., Мирошников А.И. Исследование рекомбинантных эндогенных ангиогенных пептидов, предназначенных для терапии заболеваний, ассоциированных с офтальмоангиопатиями. Материалы VII Российского симпозиума «Белки и пептиды». (Новосибирск, 12-17 июля 2015). 201.
3. **Esipov R.S.**, Stepanenko V.N., Kostromina M.A., Makarov D.A., Abramchik Yu.A., Muravyova T.I., Chupova L.A., Miroshnikov A.I. Pilot-scale intein-based biotechnologies for production therapeutic proteins. Abstracts of International conference on bioorganic chemistry, biotechnology and bionanotechnology dedicated to 55-th Anniversary of the M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science and 80th Anniversary of Prof. Yuri Ovchinnikov. (Moscow September 15-19, 2014). Special issue №1 ActaNaturae, p. 21.
4. Kostromina M.A., **Esipov R.S.** Biotechnological production of pharmaceutical antithrombotic substances – Lepirudin and Desirudin. Abstracts of International conference on bioorganic chemistry, biotechnology and bionanotechnology dedicated to 55-th Anniversary of the M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science and 80th Anniversary of Prof. Yuri Ovchinnikov. (Moscow September 15-19, 2014). Special issue №1 ActaNaturae, p.28
5. Makarov D.A., Stepanenko V.N., **Esipov R.S.** Development of acetylated peptides in vivo production concepts: case study of thymosin beta-4. Abstracts of International conference on bioorganic chemistry, biotechnology and bionanotechnology dedicated to 55-th Anniversary of the M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science and 80th Anniversary of Prof. Yuri Ovchinnikov. (Moscow September 15-19, 2014). Special issue №1 ActaNaturae, p. 32
6. Stepanenko V.N., Muravyova T.I., Makarov D.A., Zvereva I.O., Oleynik N.V., **Esipov R.S.** Development of pilot-scale biotechnologies for production of analgesic peptide toxins for preclinical studies. Abstracts of International conference on bioorganic chemistry, biotechnology and bionanotechnology dedicated to 55-th Anniversary of the M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science and 80th Anniversary of Prof. Yuri Ovchinnikov. (Moscow September 15-19, 2014). Special issue №1 ActaNaturae, p. 42.
7. Kostromina M.A., **Esipov R.S.** Biotechnological production of recombinant analogues of natural thrombin inhibitors from different haematophagous animals. FEBS Journal Special

Issue: Abstracts of 38th FEBS Congress, (Saint Petersburg, Russia, July 6–11, 2013). p. 608

8. Зверева И.О., Степаненко В.Н., **Есипов Р.С.** Разработка эффективной технологии получения рекомбинантного пуротоксина-1. Материалы VI Российского симпозиума «Белки и пептиды». (Уфа, 11-15 июня 2013) с. 266.
9. Костромина М.А., **Есипов Р.С.** Биотехнологический способ получения аналогов природных ингибиторов тромбина из различных организмов-гематофагов. Материалы VI Российского симпозиума «Белки и пептиды». (Уфа, 11-15 июня 2013) с. 268.
10. Ярославцева А.К., Курейкин Б.Б., Степаненко В.Н., **Есипов Р.С.** Получение гомодимерных рекомбинантных белков, содержащих структурный мотив «цистеиновый узел». Материалы VI Российского симпозиума «Белки и пептиды». (Уфа, 11-15 июня 2013) с. 216.
11. Зверева И.О., Степаненко В.Н., **Есипов Р.С.** Интеин-опосредованное получение рекомбинантного пуротоксина-1. Тезисы докладов на XXV Международной молодежной научной школе: «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» посвященной 30-летию НЦ ИБХ РАН. (Москва, 11-15 февраля 2013). с. 48.
12. Moiseeva E., Beyrakhova K., Semushina S., Aronov D., **Esipov R.** Different *in vivo* effects of a recombinant tumstatin-derived peptide T8 in two mouse models of breast cancer. Poster Programme of the 26th Annual Symposium of The Protein Society, August 5-8, 2012, in San Diego, p. 114.
13. Бейрахова К.А., **Есипов Р.С.** Интеин-опосредованное рекомбинантного аналога функционального фрагмента тумстатина – эффективного природного ингибитора ангиогенеза. Сборник тезисов 16 Межд. Пушинской школы-конференции молодых ученых. Биология- Наука XXI века. (Пушино, 16-21 апреля 2012). с. 248.
14. **Есипов Р.С.** Создание биотехнологий получения рекомбинантных полипептидов на основе экспрессионных интеиновых систем. Сборник тезисов научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии « X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14-17 ноября 2011 г., с. 23.
15. **Есипов Р.С.**, Степаненко В.Н., Мирошников А.И. Экспрессионные системы на основе интеинов в биотехнологии. Применение и ограничения. Тезисы докладов V Российского симпозиума «Белки и пептиды», (Петрозаводск, 8-14 августа 2011). с.72.
16. Бейрахова К.А., Чупова Л.А., Лихванцева В.Г., Степанова Е.В., **Есипов Р.С.** Рекомбинантный фрагмент фактора дифференцировки пигментного эпителия (44-77) препятствует развитию патологической неоваскуляризации роговицы. Тезисы докладов V Российского симпозиума «Белки и пептиды», (Петрозаводск, 8-14 августа 2011). с. 413.
17. Ярославцева А.К., Степаненко В.Н., **Есипов Р.С.** Получение рекомбинантного сосудистого эндотелиального фактора роста. Тезисы докладов V Российского симпозиума «Белки и пептиды», (Петрозаводск, 8-14 августа 2011). с. 313.
18. Костромина М.А., **Есипов Р.С.** Получение модифицированного [Leu1,Thr2]-63-десульфатогирудина-1 пролонгированного действия. Тезисы докладов V Российского симпозиума «Белки и пептиды» (Петрозаводск, 8-14 августа 2011). с. 304.

19. Бейрахова К.А., Лихванцева В.Г., Степанова Е.В., **Есипов Р.С.** Биотехнологический синтез тумстатина(69-95) и эндостатина(1-49), потенциальных препаратов для комплексной антиангиогенной терапии. Тезисы докладов на НПК «БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения». (Новый Свет, Крым, Украина 23–28 мая 2011). с. 347.
20. Тюрин О.В., Степаненко В.Н., Степанова В.Е., **Есипов Р.С.** Получение рекомбинантного сосудистого эндотелиального фактора роста. Тезисы III Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологии и медицины» (Ростов-на-Дону, 1-4 окт. 2009 г.) с. 30.
21. Костромина М.А., Муравьева Т.И., **Есипов Р.С.** Аналоги гирудина – потенциальные антитромботические препараты. Тезисы III Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологии и медицины» (Ростов-на-Дону, 1-4 окт. 2009 г.) с. 188.
22. Бейрахова К.А., **Есипов Р.С.** Способ С-концевого амидирования рекомбинантных полипептидов с использованием интеинов на примере оксинтомодулина человека. Тезисы IV Российского симпозиума «Белки и пептиды» (Казань, 23-27 июня, 2009), с.303.
23. Костромина М.А., **Есипов Р.С.** Интеин-опосредованное получение аналогов гирудина. Тезисы IV Российского симпозиума «Белки и пептиды» (Казань, 23-27 июня, 2009), с.33.
24. **Есипов Р.С.**, Степаненко В.Н., Костромина, Бейрахова К.А., Мирошников А.И. Перспективы использования в биотехнологическом производстве гибридных саморасщепляющихся белков для получения рекомбинантных полипептидов. Тезисы докладов и стендовых сообщений на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. 11-15 мая 2008, Новосибирск, 358.
25. Костромина М.А., Степаненко В.Н. **Есипов Р.С.**, Мирошников А.И. Получение рекомбинантного гирудина и его аналогов с использованием систем белкового сплайсинга. Тезисы докладов и стендовых сообщений на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. 11-15 мая 2008, Новосибирск, 346.
26. Бейрахова К.А., Степаненко В.Н., **Есипов Р.С.**, Мирошников А.И. Получение рекомбинантного тимозина альфа-1. Тезисы докладов и стендовых сообщений на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. 11-15 мая 2008, Новосибирск, 344.
27. **Есипов Р.С.**, Степаненко В.Н., Мирошников А.И. Перспективы использования в биотехнологическом производстве гибридных саморасщепляющихся белков для получения рекомбинантных полипептидов. Тезисы докладов и стендовых сообщений на III Российском симпозиуме «Белки и пептиды». 16- 21 сентября, 2007, Пущино.
28. **Есипов Р.С.**, Степаненко В.Н., ГуревичА.И., Чупова Л.А., Муравьева Т.И., Мирошников А.И. Новые подходы к биосинтетическому получению биологически активных полипептидов. Тезисы докладов и стендовых сообщений VIII чтений, посвященных памяти академика Ю.А.Овчинникова, 25-27 октября, 2006, Москва-Пущино, 120.
29. Бейрахова К.А., Костромина М.А., Степаненко В.Н., **Есипов Р.С.** Использование системы белкового сплайсинга для одностадийного выделения рекомбинантного ЭРФ. Материалы конференции “Биотехнология и медицина” в рамках 4-ого

Московского международного конгресса “БИОТЕХНОЛОГИЯ: состояние и перспективы развития” 14-17 марта 2006 г. Москва. с. 60.

30. Костромина М.А., Бейрахова К.А., Степаненко В.Н., **Есипов Р.С.** Рекомбинантный оксинтомодулин – потенциальный препарат для лечения ожирения. Материалы конференции “Биотехнология и медицина” в рамках 4-ого Московского международного конгресса “БИОТЕХНОЛОГИЯ: состояние и перспективы развития” 14-17 марта 2006 г. Москва. с. 61.
31. Степаненко В.Н., Чувиковский Д.В., **Есипов Р.С.**, Гуревич А.И., Мирошников А.И. Биотехнология рекомбинантных полипептидных препаратов медицинского назначения. Тезисы докладов на Всероссийской конференция “Фундаментальные науки – медицине”. 4-8 сентября 2005. Новосибирск. С. 54.
32. **Esipov R.S.**, Stepanenko V.N., Miroshnikov A.I. Production recombinant human thymosin- α_1 overexpressed as intein fusion protein in *E.coli*. Abstracts at 12th European Congress on Biotechnology 21-24 August 2005 Copenhagen, Denmark. Journal of biotechnology 118S1.
33. **Есипов Р.С.**, Степаненко В.Н., Чупова Л.А., Чувиковский Д.В., Гуревич А.И., Мирошников А.И. Рекомбинантный тимозин α_1 . Тезисы докладов и стендовых сообщений VII чтений посвященных памяти академика Ю.А. Овчинникова. 4-7 октября 2004. с.35.
34. **Есипов Р.С.**, Гуревич А.И., Чупова Л.А., Швец С.В., Муравьева Т.И., Мирошников А.И. Получение рекомбинантного окситоцина. VI Межд. конф. РФФИ. Результаты фундам. исслед. для инвестиций. Молек. медицина. Пушино.24-26 апр. 2001. Тезисы докл.-2001. с. 48-49.

Производственные регламенты:

1. **Есипов Р.С.**, Степаненко В.Н., Костромина М.А., Шибанова Е.Д., Сизова Н.В., Давыдов В.Л., Муравьева Т.И. Опытнo-промышленный регламент на производство лекарственного средства «Пигастин», модифицированный фрагмент [44-77] фактора роста пигментного эпителия, человеческий, генноинженерный, раствор для инъекций, 50 мкг. ОПР 02699487–27–15.
2. **Есипов Р.С.**, Степаненко В.Н., Костромина М.А. Шибанова Е.Д., Сизова Н.В., Давыдов В.Л., Муравьева Т.И., Мирошников А.И. Опытнo-промышленный регламент на производство лекарственного средства на производство лекарственного средства «Тумастин», Модифицированный фрагмент [69-95] тумстатина, человеческий, генноинженерный, раствор для инъекций, 50 мкг. ОПР 02699487–26–15.
3. **Есипов Р.С.** Муравьева Т.И., Степаненко В.Н., Чупова Л.А., Шибанова Е.Д., Сизова Н.В., Давыдов В.Л., Соколова И.В., Макаров Д.А. Опытнo-промышленный регламент на производство лекарственного средства «Пептальгин-В1», рекомбинантный анальгетик АРНСЗ, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, 3 мг. ОПР 02699487–25–15.
4. **Есипов Р.С.**, Степаненко В.Н., Муравьева Т.И., Чупова Л.А., Шибанова Е.Д., Сизова Н.В., Давыдов В.Л., Соколова И.В. Опытнo-промышленный регламент на производство лекарственного средства «Пунальгин», рекомбинантный анальгетик РТ1, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 3 мг. ОПР 02699487–21-14.
5. **Есипов Р.С.**, Муравьева Т.И., Степаненко В.Н., Чупова Л.А., Шибанова Е.Д., Сизова Н.В., Давыдов В.Л., Соколова И.В. «Опытнo-промышленный регламент на

производство активной фармацевтической субстанции Глюкагон рекомбинантный, человеческий генно-инженерный» № ОПР 02699487–09–13.

6. **Есипов Р.С.**, Муравьёва Т.И., Степаненко В.Н., Чупова Л.А., Шибанова Е.Д., Сизова Н.В., Давыдов В.Л., Соколова И.В. Опыт-но-промышленный регламент на производство лекарственного препарата «Глюкоран», глюкагон рекомбинантный, человеческий генноинженерный, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 1 МЕ» № ОПР 02699487–11–13.
7. **Есипов Р.С.**, Муравьёва Т.И., Степаненко В.Н., Чупова Л.А., Шибанова Е.Д., Сизова Н.В., Давыдов В.Л., Соколова И.В. «Глюкоран», глюкагон рекомбинантный, человеческий генноинженерный, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 1 МЕ. Промышленный регламент ПР 02699487-19-14.
8. **Есипов Р.С.**, Муравьёва Т.И., Степаненко В.Н., Чупова Л.А., Шибанова Е.Д., Сизова Н.В., Давыдов В.Л., Соколова И.В. Опыт-но-промышленный регламент на производство субстанции ОМ-ПСК-14 (конъюгат рекомбинантного окситомодулина человека и полисиаловой кислоты, фракция 14 кДа). ОПР 02699487-14-12.

Работа была выполнена при поддержке:

грантов РФФИ №13-04-00731, № 09-04-12123-офи_м, № 08-04-13626-офи_ц

государственных контрактов Минпромторга РФ:

«Доклинические исследования лекарственного средства группы анальгетиков на основе рекомбинантных полипептидов, специфичных к ванилоидным рецепторам». № 13411.1008799.13.078 от 28.05.2013

«Доклинические исследования лекарственного средства на основе рекомбинантных эндогенных антиогенных пептидов, предназначенных для терапии заболеваний, ассоциированных с офтальмоангиопатиями». № 13411.1008799.13.079 от 28.05.2013

«Доклинические исследования полипептидного анальгетика, селективно взаимодействующего с пуринергическими рецепторами». №16.N08.12.1023 от 14.06.2012.

«Разработка технологии и организация производства биотехнологического жизненно необходимого и важнейшего лекарственного средства Глюкагон, не производимого отечественными производителями и не защищенного патентами иностранных компаний на территории Российской Федерации». № 12411.1008799.13.173 от 10.10.2012

«Производство АФС рекомбинантного окситомодулина человека». Договор № 1-37/1-ПР-06-11 от 28.06.2010 г. в рамках ГК № 11411.0810200.13.B17 от 21.06.2011 г.

«Масштабирование технологии производства рекомбинантного белкового препарата пролонгированного гипогликемического действия – аналога эксенатида для лечения сахарного диабета второго типа». № 10411.0810200.13.B14 от 27.04.2010 г.

«Разработка технологии производства рекомбинантного белкового препарата пролонгированного действия гипогликемического препарата - аналога эксенатида». № 9411.0810200.13.B18 от 10.11.2009 г.