

Характеризация субстанции рекомбинантного эритропоэтина человека, полученной на основе штамма клеток яичника китайского хомячка CHOpe — продуцента эритропоэтина

И. Ф. Радаева*, В. А. Терновой, А. О. Семенцова, Н. Б. Думченко, Е. А. Нечаева

Федеральное бюджетное учреждение науки

«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
г.п. Кольцово, Новосибирская область, 630559, Российская Федерация

Разработка и внедрение в клиническую практику препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека (рчЭПО) продолжают оставаться актуальными в настоящее время. Для получения разрешения на проведение клинических исследований таблетированной формы рчЭПО для перорального применения проведены дополнительные исследования для подтверждения пригодности штамма-продуцента CHOpe для производства рчЭПО и соответствия характеристик субстанции требованиям, предъявляемым к ЭПО. **Цель работы:** характеристика субстанции рчЭПО, полученной на основе клеток штамма продуцента CHOpe, в соответствии с требованиями, предъявляемыми к ЭПО. **Материалы и методы:** субстанцию рчЭПО получали при культивировании штамма клеток яичника китайского хомячка CHOpe. Экспрессирующую конструкцию штамма-продуцента оценивали с помощью методов определения нуклеотидной и аминокислотной последовательностей. Секвенирование нуклеотидной последовательности, кодирующей ген ЭПО человека, проводили по методу Сэнгера. Аминокислотную последовательность С- и N-концов молекулы рчЭПО определяли методом Эдмана. Копийность гена ЭПО в клетках CHOpe определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Свойства субстанции рчЭПО изучали в соответствии с требованиями, предъявляемыми к ЭПО. Подлинность субстанции рчЭПО определяли с помощью методов изoeлектрического фокусирования, пептидного картирования и электрофореза в полиакриламидном геле. Для определения соотношения изоформного состава использовали метод капиллярного электрофореза. Для выявления примесей димеров и высокомолекулярных родственных веществ в субстанции применяли метод высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления. Содержание белка и остаточных нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрическим методом. Концентрацию субстанции рчЭПО оценивали методом иммуноферментного анализа. **Результаты:** подтверждена генетическая стабильность штамма-продуцента CHOpe, доказана идентичность аминокислотной последовательности N- и C-концов молекулы рчЭПО природному ЭПО. На основе штамма-продуцента CHOpe получена субстанция рчЭПО, которая является гомогенной и не содержит примесей олигомерных форм ЭПО. Димеры и высокомолекулярные родственные вещества составляют менее 0,5%. Молекулярная масса рчЭПО находится в диапазоне значений от 32 до 38 кДа, изoeлектрическая точка — от 2,8 до 4,15. Идентифицированы пики изоформ 1–8, изоформный состав субстанции рчЭПО соответствует ЭПО. Установлено, что в 1 моль субстанции содержится 13,75 моль сиаловых кислот. **Выводы:** подтверждена пригодность штамма-продуцента CHOpe для производства рчЭПО. Полученная субстанция рчЭПО соответствует требованиям, предъявляемым к ЭПО.

Ключевые слова: продуцент эритропоэтина; штамм клеток CHOpe; нуклеотидная последовательность; молекулярная масса; подлинность; пептидное картирование; димеры; сиаловые кислоты

Для цитирования: Радаева ИФ, Терновой ВА, Семенцова АО, Думченко НБ, Нечаева ЕА. Характеризация субстанции рекомбинантного эритропоэтина человека, полученной на основе штамма клеток яичника китайского хомячка CHOpe — продуцента эритропоэтина. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(2):116–125. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-116-125>

Контактное лицо: Радаева Ирина Федоровна; radaeva@vector.nsc.ru

Characterisation of Recombinant Human Erythropoietin Obtained from CHOpe—Erythropoietin Producing Strain of Chinese Hamster Ovary Cells

I. F. Radaeva*, V. A. Ternovoy, A. O. Sementsova, N. B. Dumchenko, E. A. Nechaeva

State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”,
Koltsovo, Novosibirsk Oblast 630559, Russian Federation

Development and implementation in clinical practice of recombinant human erythropoietins (rhEPOs) remain a priority task today. Additional studies were performed in order to obtain clinical trial authorisation for rhEPO tablets for oral use. The studies were aimed to demonstrate the suitability of the erythropoietin producer strain based on Chinese hamster ovary cells (CHOpe) for the production of rhEPO, and the compliance of the substance characteristics with the requirements for erythropoietin (EPO). **The aim of the study** was to characterise the rhEPO substance obtained from the CHOpe strain cells in accordance with the requirements for EPO. **Materials and**

methods: the rhEPO substance was obtained by culturing the strain of Chinese hamster ovary cells—CHOpe. The expression construct of the producer strain was evaluated using methods for determination of nucleotide and amino acid sequences. The Sanger method was used to perform sequencing of the nucleotide sequence encoding the human EPO gene. The amino acid sequences of the rhEPO molecule C- and N-termini were determined by the Edman method. The copy number of the EPO gene in CHOpe cells was determined by real-time polymerase chain reaction. The properties of the rhEPO substance were evaluated in accordance with the requirements for EPO. Isoelectric focusing, peptide mapping, and polyacrylamide gel electrophoresis were used for identification of the rhEPO substance. The ratio of isoform composition was determined by capillary electrophoresis. Dimer impurities and high molecular weight related substances were determined by high-pressure liquid chromatography. The content of protein and residual nucleic acids was determined by spectrophotometry. The concentration of the rhEPO substance was assessed by enzyme immunoassay. **The results of the study** confirmed genetic stability of the CHOpe producer strain and demonstrated identity of N- and C-terminal amino acid sequences of the rhEPO molecule to those of the natural EPO. The CHOpe producer strain was used to obtain a rhEPO substance which is homogenous and does not contain impurities of EPO oligomeric forms. Dimers and high molecular weight related substances account for less than 0.5%. The rhEPO molecular weight ranges from 32 to 38 kDa, and the isoelectric point is within 2.8–4.15. The study identified the peaks of isoforms 1–8, the isoform composition of the rhEPO substance corresponds to that of EPO. It was determined that 1 mol of the substance contains 13.75 mols of sialic acids. **Conclusions:** the study confirmed the suitability of the CHOpe producer strain for the production of rhEPO. The obtained rhEPO substance meets requirements for EPO.

Key words: erythropoietin producer; CHOpe cell strain; nucleotide sequence; molecular weight; identification; peptide mapping; dimers; sialic acids

For citation: Radaeva IF, Ternovoy VA, Sementsova AO, Dumchenko NB, Nechaeva EA. Characterisation of recombinant human erythropoietin obtained from CHOpe—erythropoietin producing strain of Chinese hamster ovary cells. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(2):116–125. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-116-125>

Corresponding author: Irina F. Radaeva; radaeva@vector.nsc.ru

Разработка и внедрение в клиническую практику препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека (рчЭПО) продолжают оставаться актуальными в настоящее время. Эритропоэтин (ЭПО) — гормон, контролирующий и регулирующий эритропоэз. ЭПО широко применяется в клинической практике при заболеваниях, сопровождающихся анемией [1–4]. В настоящее время существуют препараты рчЭПО в виде инъекционных форм для подкожного и внутривенного введения. Создание новой формы рчЭПО для перорального применения позволит решить ряд проблем, связанных с назначением и контролем приема препарата. Поскольку пероральная форма легко дозируется, это поможет избежать передозировки гормона при лечении и не потребует привлечения квалифицированного медицинского персонала, пациент самостоятельно сможет принимать препарат. Пероральная форма препарата позволит предотвратить как быструю инактивацию, так и резкое одномоментное повышение концентрации гормона в крови, а также снизить количество побочных эффектов.

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора был сконструирован штамм-продуцент рчЭПО [5]. Штамм клеток CHOpe депонирован в специализированную коллекцию перевиваемых соматических клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур (ИНЦ РАН) под номером ВСКК/П/626Д. Культура клеток не содержала посторонних агентов, являлась онкогенно безопасной, сохраняла стабильность биологических свойств в течение 20 последовательных пассажей. Созданы и заложены на хранение при температуре жидкого азота посевные и рабочие банки клеток CHOpe. Банки аттестованы в соответствии с национальными¹ и международными² требованиями Всемирной организации здравоохранения. Запаса клеток в банках достаточно для того, чтобы обеспечить в течение нескольких лет производство рчЭПО стандартным клеточным материалом [6].

На основе использования штамма-продуцента CHOpe разработана технология получения лиофилизированной субстанции рчЭПО [7]. Субстанция использовалась для создания таблетированной формы препарата, не имеющей мировых аналогов [8]. Таблетированная форма рчЭПО обладает выраженным стимулирующим действием на эритропоэз. Количественные характеристики эритропоэз-стимулирующих свойств инъекционной и таблетированной форм были сопоставимы. В ходе проведения доклинических исследований при однократном и повторном использовании препарата на лабораторных животных не наблюдались какие-либо токсические реакции, переносимость таблетированной формы рчЭПО была удовлетворительной [9].

При разработке таблетированной формы рчЭПО ряд свойств препарата остался неизученным. Поэтому при проведении доклинических исследований и подготовке документов для представления в Минздрав России с целью получения разрешения на проведение клинических исследований нами были проведены дополнительные исследования для подтверждения пригодности штамма-продуцента CHOpe для производства рчЭПО, а также субстанции рчЭПО требованиям, предъявляемым к ЭПО.

Цель работы — характеристика субстанции рчЭПО, полученной на основе штамма-продуцента CHOpe, в соответствии с требованиями, предъявляемыми к ЭПО.

Материалы и методы

Клетки CHOpe культивировали в стационарных условиях при температуре 37 °C в питательной среде Игла MEM (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), гипоксантина в концентрации 100 мкМ, аминоптерина — 20 мкМ и тимидина — 100 мкМ (Sigma-Aldrich, США). В качестве накопительной среды использовали 98% питательной среды Игла MEM и 2%

¹ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Ч. 2. М.: Гриф и К; 2012.

² Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks (WHO/BS/10.2132). WHO; 2010.

FetalClone II (HyClone, США). Каждые 3–4 сут проводили сбор культуральной жидкости (КЖ), содержащей рчЭПО. КЖ фильтровали через ацетатцеллюлозные мембраны с размерами пор 0,45 и 0,22 мкм (Merck Millipore, США) на установке УСФ-273 (НПП «Технофильтр», Россия). Далее КЖ концентрировали, используя разделительный ультрафильтрационный аппарат на полых волокнах AP-0,2н (НПП «Биотехпрогресс», Россия).

Выделение и очистку субстанции рчЭПО из концентрата КЖ проводили с использованием хроматографической системы АКТА Purifier (GE Healthcare, США). Очистка включала следующие стадии: хроматографию на ионосорбенте PC/ED7-Sepharose FF (ООО «Протеиновый контур», Россия), сорбенте Q Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, США) и гелефильтрацию на Sephacryl S-200 SF (GE Healthcare, США). Субстанцию рчЭПО пропускали через фильтры с размером пор 0,22 мкм (TPP, Швейцария) [7].

Секвенирование нуклеотидной последовательности фрагмента гена, кодирующего синтез ЭПО человека, интегрированного в ДНК клеток, проводили с помощью генетического анализатора 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Inc., США) по методу Сэнгера [10]. Для секвенирования использовали олигонуклеотиды (ООО «Биосинтез», Россия):

F527	AATGTCCTGCCTGGCTGTGG
R696	TCCCTGAAGCCCTGAGCGTG
R1837	TCATCTGTCCCCTGTCTCTGC
F1643	TTGCTAAGACTGTCCGTATCTTCCC

Аминокислотную последовательность С- и N-концов молекулы рчЭПО определяли на автоматическом газожидкостном секвенаторе PPSQ-31A (Shimadzu, Япония). Методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии идентифицировали фенилтиогидантоины аминокислот, полученные в каждом цикле секвенирования³.

Стабильность штамма-продуцента CHO⁺ подтверждали сравнением кодирующей части гена ЭПО с референсной последовательностью гена ЭПО человека после секвенирования фрагмента 1310 п.н. до и после культивирования клеток в течение 10 последовательных пассажей.

Копийность гена ЭПО в клетках CHO⁺ исследовали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). При помощи набора для выделения РНК/ДНК (НПФ «Литех», Россия) из 1×10⁶ клеток выделяли ДНК. Для постановки ПЦР использовали амплификатор CFX96 (Bio-Rad, США), праймеры и флуоресцентно-меченый зонд (ООО «Биосинтез», Россия):

F527	AATGTCCTGCCTGGCTGTGG
R696	TCCCTGAAGCCCTGAGCGTG
Proba	FAM-TATCACCTTCCCAGCACATTCCACAGA-BHQ1

В качестве положительного контрольного образца применяли рекомбинантную плазмиду pCR2.1-EP, содержащую вставку, идентичную участку гена, кодирующего ЭПО (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия). Отрицательным контролем служил TE(×1)-буфер.

Для определения аналитической чувствительности системы «праймеры—зонд» из растворов положительных контрольных

образцов готовили последовательные 10-кратные разведения. Определение концентрации ДНК в разведениях осуществляли при помощи коммерческого набора Quant-iTTM dsDNA Assay Kit, high sensitivity (InvitrogenTM, США) и флуориметра QUBIT (InvitrogenTM, США). Количество ДНК-матриц, детектируемое с применением праймеров и зондов, после оптимизации условий проведения реакции выражали в геномных эквивалентах в реакционной смеси. Электрофоретическую детекцию продуктов амплификации проводили в 2% агарозном геле, использовали системы видеодокументирования Molecular Imager[®] Gel DocTM XR System (Bio-Rad, США). После проведения ПЦР полученные фрагменты ДНК очищали, используя набор QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen[®], США), клонировали в плазмиду pCR2.1-EP. Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе ABI Genetic 3130 XL (Applied Biosystems, Inc., США). Нуклеотидные последовательности гена ЭПО были взяты из базы данных GenBank [07q21/EPO] и проанализированы с использованием NCBI Mega BLAST.

Статистическую обработку полученного материала проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили при помощи приложения AlignX программного пакета Vector NTI 11 (Informax, США). В работе было использовано лицензионное программное обеспечение Microsoft Office Professional 2007 Win32, Vector NTI Suite 11, Lasergene 9 и BioEdit 7.1.3.0. Физико-химические свойства полученной субстанции рчЭПО определяли в соответствии с Европейской фармакопеей и Государственной фармакопеей Российской Федерации (ГФ РФ)⁴.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) и приготвление геля проводили в соответствии с методикой, изложенной в ГФ РФ XIV издания⁵. В качестве маркеров молекулярной массы использовали набор низкомолекулярных стандартных белков 94,0; 66,0; 45,0; 30,0; 20,1; 14,4 кДа (Amersham Bioscience, Швеция). Контролем служил стандарт ЭПО [R030] (ООО «Протеиновый контур», Россия).

Для проведения изoeлектрофокусирования использовали аппарат MultiphorTM II в комплекте с аппаратом для охлаждения и циркуляции жидкости, источник питания (Amersham Biosciences, Швеция), готовые гели (GE Healthcare, США). Для создания градиента pH в геле применяли амфолиты (pH 3,0–10,0) (Sigma-Aldrich, США) и амфолиты (pH 3,0–5,0) (Bio-Rad, США), для калировки геля — pI маркеры (pH 2,8–3,5–3,75–4,15–4,55–5,2–5,85–6,55) (GE Healthcare, США). Гель окрашивали 0,1% раствором кумасси бриллиантовый голубой (MP Biochemicals, Канада). В качестве контроля использовали Международный стандартный образец эритропоэтина (МСО ЭПО) BRP E1515000 (Sigma-Aldrich, США).

Пептидное картирование с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) проводили на хроматографе высокого давления Breeze Waters (Waters, США) с детектором поглощения в УФ-диапазоне при длине волны 214 нм, применяли колонку Symmetry 300 C4 (Waters, США)⁶.

Разделение изоформ рчЭПО проводили методом капиллярного электрофореза⁷. В качестве контроля использовали МСО ЭПО. Расчет процентного содержания изоформ проводили при помощи системы капиллярного электрофореза PA 800 plus (Beckman Coulter, США).

³ Erythropoietin Concentrated Solution. European Pharmacopoeia 7.0.

⁴ Erythropoietin Concentrated Solution. European Pharmacopoeia 7.0.

Общая фармакопейная статья 1.7.1.0016.18 Эритропоэтины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁵ Общая фармакопейная статья 1.2.1.0023.15 Электрофорез в полиакриламидном геле. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁶ Erythropoietin Concentrated Solution. European Pharmacopoeia 7.0.

⁷ Там же.

GGTACCCCGCGCGCCCCAGGTGCTGAGGGACCCCGGCCAGGCGCGGAGACGGTGAGTACTCGCGGGCTGGGCGCTCCCGCCGCCCGGGTCC
CTGTTTGTAGCGCCCGGCTATTGGCCAGGAGGTGGCTGGGTTCAAGGACCGGCGACCCCGGAAGGGGGAGGGGGGTGGGCGAGCCTCCACGT
GCCAGCGGGGACTCTTGGGGATGGCAAAACCTGACCTGTGAAGGGACACAGTTTGGGGGTTAGGTTTGGGGGTTCTGCTGTGCCAGTGGAGA
GGAAGCTGATAAGCTGATATGGAGCCACCACTTATCTGCCAGAGGGGAAGCCTCTGTACACCAGGATTCCGAGAAGTGGATGCTGGTAGCTGGG
GGTGGGGTGTGCACACGGCAGCAGAGGGCCAGGGAGGCAGCACCTGAGTGTTCATGGTTGGGGACAGGAAGGACAGAGACGTGGGGATGAAG
GAAGCTGTCTTCCACAGCCACCTTCTCCCACTCTCAGCCTGGCTATCTGTTCTAGAATGCTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCCGTGTGCTCCCTCT
GGGCTCCAGTCTGCGGCGCCACCACGCTCACCGAGTCTGGAGAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAATATCACCTTCCCA
GCACATCCACAGAACTCACGCTCAGGGCTTCAAGGAACTCCAGGAACCTGGCACTTGGTTTGGGGTGGAGTTGGGAAGCTAGACACTGCCAGA
ATAAGTCTGGTGGCCCCAAACCATACCTGGAACCTAGGCAAGGAGCAATCTACGGCTGTGGGCCAGGGCCAGGCCTTCAGGGACCTTCACTC
CCGCACTTTCAGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTGAATGAGAATATCACACCAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGGATGGAGGTGAGTTC
CTTTTCTTTCTTTTGGAGAATCTCATTTGCGAGCCTGATTTGGATGAAAGGGAGGGAAAGGTAATGGAGCAGCAGAGATGAGGCTGCCTGG
CGCAGAGGCAATCCAGGCTGAGATGGCCGAGATGGGGAATGCTTGAAGCCTGGAGTCTAGGCAGCATAGTGAGATCCCCCATCTCTACAA
ACATTTAAAAAATAGTGGTGCATGGTGGTAGTCCAGATATTTGGAAGGCTGAGGCGGGAGGACCAGGAATTTGAGGCTGCAGTGAGCTGTGA
TCACACCACTGCACCTCCAGCGAGTGAGGCCCTGTCTCAAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAATAATGAGGGTACATTATTATTCATCTCACTC
ACTCACTCATTCTATTCTCTTATTGCATACCTTCTGTTTGTCTGAGCTTGGTGTGGGCTGTGAGGAGAGGGTGACATGGGTGAGCTG
ACTCCAGAGTCCACTCCCTGTAGGTCCCGTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTGCGAAGCTGTCTGCGGTGTTGGTCAACTCTTCCC
AGCCGTGGGAGCCCTGCAGCTGCATGTGGATGTGGCCTTCGAGCCTCACCACTCTGCTTGGGGCTCTGGGAGCCAGGTGGACACTTCTGCTT
GCCCTTTCTGTAAGAAGGGGAGAAGGCTTGTCTAAGACTGTCGATCCTTCCCTTTCTGTGGCACTGCAGCGACCTCTGTTTTCAAGGAAGCC
ATCTCCCTCCAGATGCGGCTCAGTGTCTCACTCCGAACGACACTTCCGCAACTCTTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGAAATACAC
AGGGGAGGCCTGCAGGACAAGGGGACAGATGACCAGGTGTGTCCATCCACCACCTCCCTCACCAATTTGCTTGTGCCACACCTCCCCGCCAC
CGTCGAGGGGCTCTCAGCTCAGCCAGCCTGTCCATGGACACTCCAGTGCATCTCAGGGGCCAGAGGAATGTGGAGAGGCAACTCTGAGATCT

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность, кодирующая ЭПО человека, в ДНК клеток CHOpe.
Fig. 1. The nucleotide sequence encoding human EPO integrated into the DNA of CHOpe cells.

Для выявления примесей димеров и высокомолекулярных родственных веществ в рЭПО использовали метод ВЭЖХ. Хроматографию осуществляли на хроматографе высокого давления Breeze Waters (США) с детектором поглощения в УФ-диапазоне при длине волны 214 нм, применяли колонку Protein-Pak 125 (Waters, США), заполненную силикагелем гидрофильным для хроматографии, пригодным для фракционирования глобулярных белков с относительной молекулярной массой от 2 до 80000⁸.

Оценку сиаловых кислот проводили по методике, изложенной в Европейской фармакопее⁹. Для построения калибровочной кривой применяли стандартный раствор N-ацетилнейраминоновой кислоты (Sigma-Aldrich, США). Используя калибровочную кривую, определяли содержание сиаловых кислот в рЭПО, рассчитывали среднее количество молей сиаловых кислот на 1 моль ЭПО, допуская, что относительная молекулярная масса ЭПО равна 30600, а относительная молекулярная масса N-ацетилнейраминоновой кислоты — 309.

Спектрофотометрическим методом определяли содержание остаточных нуклеиновых кислот¹⁰ в субстанции. Раствором сравнения служил буферный раствор, идентичный буферному раствору анализируемой пробы.

Концентрацию рЭПО определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов PRoCop EPO2 (ООО «Протеиновый контур», Россия) и коммерческого набора реагентов Эритропоэтин-ИФА-Бест (Вектор-Бест, Россия). Диапазон измеряемых концентраций — 0–6,6 МЕ/мл, чувствительность анализа — 0,01 МЕ/мл.

Результаты и обсуждение

Культура клеток CHOpe состояла из субстратзависимых эпителиоподобных клеток. Клетки обеспечивали синтез и секрецию в культуральную жидкость (КЖ) рЭПО [5].

Экспрессирующую конструкцию штамма-продуцента оценивали с помощью методов исследования нуклеотидной и аминокислотной последовательностей.

Секвенирование фрагмента гена ЭПО, интегрированного в ДНК клеток CHOpe (рис. 1), подтвердило полное соответствие структуре гена [07q21/EPO] ЭПО [11].

При определении аминокислотной последовательности N- и C-концов молекулы рЭПО было показано, что N-концевая последовательность соответствует аминокислотам Ala-Pro-Pro-Arg-Leu-Ile-Cys-Asp-Ser-Arg, C-концевая последовательность — Thr-Gly-Glu-Ala-Cys-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg. Установленная аминокислотная последовательность N- и C-концов рЭПО идентична последовательности природного ЭПО [10].

Стабильность продукции культуры клеток является фактором, отражающим стабильность амплифицированного состояния гена. Результаты исследований, подтверждающие стабильность штамма-продуцента CHOpe, были получены на основании сравнения кодирующей части гена ЭПО до и после культивирования клеток CHOpe в течение 10 последовательных пассажей. Нуклеотидная последовательность части гена ЭПО не содержала нуклеотидных замен (рис. 2).

В стабильных культурах клеток амплифицированные последовательности сохраняются в виде копий, интегрированных в хромосомы. Поскольку амплифицированный участок хромосомы имеет, как правило, большие размеры, его можно выявить при окрашивании хромосом, так как при этом образуются легко различимые гомогенно окрашенные районы. Ранее было показано, что кариотип культуры клеток CHOpe стабилен, соответствует виду и представляет собой производное от кариотипа китайского хомячка, маркерная хромосома содержит HSR гомогенно окрашенные участки, которые появляются в результате генной амплификации и ассоциируются с амплификацией встроенного гена и соответственно с усилением синтеза рекомбинантного белка [12, 13].

Генетическую стабильность штамма-продуцента CHOpe подтверждали исследованиями копииности гена. В результате проведенных исследований было установлено, что

⁸ Там же.

⁹ Там же.

¹⁰ Общая фармакопейная статья 1.2.1.1.0003.15 Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Query	1	CTTCTCCTGTCCCTGCTGTGCTCCCTCTGGGCTCCAGTCTGGGCGCCCCACCACGC	60
Sbjct	5779	CTTCTCCTGTCCCTGCTGTGCTCCCTCTGGGCTCCAGTCTGGGCGCCCCACCACGC	5838
Query	61	CTCATCTGTGACAGCCGAGTCTGGAGAGGTACCTCTGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAAT	120
Sbjct	5839	CTCATCTGTGACAGCCGAGTCTGGAGAGGTACCTCTGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAAT	5898
Query	121	ATCACGGTGAGACCCCTTCCCCAGCACATTCCACAGAACTCACGCTCAGGGCTTCAGGGA	180
Sbjct	5899	ATCACGGTGAGACCCCTTCCCCAGCACATTCCACAGAACTCACGCTCAGGGCTTCAGGGA	5958
Query	181	ACTCTCTCCAGATCCAGGAACCTGGCACTTGGTTTGGGGTGGAGTTGGGAAGCTAGACAC	240
Sbjct	5959	ACTCTCTCCAGATCCAGGAACCTGGCACTTGGTTTGGGGTGGAGTTGGGAAGCTAGACAC	6018
Query	241	TGCCCCCTTACATAAGAATAAGTCTGGTGGCCCCAAACCATACCTGGAACTAGGCAAGG	300
Sbjct	6019	TGCCCCCTTACATAAGAATAAGTCTGGTGGCCCCAAACCATACCTGGAACTAGGCAAGG	6078
Query	301	AGCAAAGCCAGCAGATCCTACGGCCTGTGGGCCAGGGCCAGAGCCTTCAGGGACCCCTGA	360
Sbjct	6079	AGCAAAGCCAGCAGATCCTACGGCCTGTGGGCCAGGGCCAGAGCCTTCAGGGACCCCTGA	6138
Query	361	CTCCCCGGGCTGTGTGCATTTTCAGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAAT	420
Sbjct	6139	CTCCCCGGGCTGTGTGCATTTTCAGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAAT	6198
Query	421	ATCACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGGATGGAGGTGAGTTCC	480
Sbjct	6199	ATCACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGGATGGAGGTGAGTTCC	6258
Query	481	tttttttttttttttCCTTCTTTTGGAGAATCTCATTTCGAGCCTGATTTTGGATGAA	540
Sbjct	6259	TTTTTTTTTTTTTTTCTTCTTTTGGAGAATCTCATTTCGAGCCTGATTTTGGATGAA	6318
Query	541	AGGGAGAATGATCGAGGGAAAGGTAAAATGGAGCAGCAGAGATGAGGCTGCCTGGGCGCA	600
Sbjct	6319	AGGGAGAATGATCGAGGGAAAGGTAAAATGGAGCAGCAGAGATGAGGCTGCCTGGGCGCA	6378
Query	601	GAGGCTCAGCTCTATAATCCCAGGCTGAGATGGCCGAGATGGGAGAATTGCTTGAGCCCT	660
Sbjct	6379	GAGGCTCAGCTCTATAATCCCAGGCTGAGATGGCCGAGATGGGAGAATTGCTTGAGCCCT	6438
Query	661	GGAGTTTCAGACCAACCTAGGCAGCATAGTGAGATCCCCATCTCTACAAACATTTaaaa	720
Sbjct	6439	GGAGTTTCAGACCAACCTAGGCAGCATAGTGAGATCCCCATCTCTACAAACATTTAAAA	6498
Query	721	aaaTAGTCAGGTGAGGTGGTGCATGGTGGTAGTCCCAGATATTTGGAAGGCTGAGGCGG	780
Sbjct	6499	AAATTAGTCAGGTGAGGTGGTGCATGGTGGTAGTCCCAGATATTTGGAAGGCTGAGGCGG	6558
Query	781	GAGGATCGCTTGAGCCAGGAATTTGAGGCTGCAGTGAGCTGTGATCACACCACTGCACT	840
Sbjct	6559	GAGGATCGCTTGAGCCAGGAATTTGAGGCTGCAGTGAGCTGTGATCACACCACTGCACT	6618
Query	841	CCAGCCTCAGTGACAGAGTGAGGCCCTGTCTCaaaaaagaaaaagaaaaaagaaaaTAAT	900
Sbjct	6619	CCAGCCTCAGTGACAGAGTGAGGCCCTGTCTCaaaaaagaaaaagaaaaaagaaaaTAAT	6678
Query	901	GAGGGCTGTATGGAATAcattcattattcattcactcactcactcactcattcatt	960
Sbjct	6679	GAGGGCTGTATGGAATACATTCAATTATTCATTCACTCACTCACTCACTCACTCACT	6738
Query	961	cattcattcattcaACAAGTCTTATTGCATACCTTCTGTTTGTCTCAGCTTGGTGTGGG	1020
Sbjct	6739	CATTCACTTCAACAAGTCTTATTGCATACCTTCTGTTTGTCTCAGCTTGGTGTGGG	6798
Query	1021	GCTGTGAGGGGCGAGGAGGAGGGTGACATGGGTGAGCTGACTCCCAGAGTCCACTCC	1080
Sbjct	6799	GCTGTGAGGGGCGAGGAGGAGGGTGACATGGGTGAGCTGACTCCCAGAGTCCACTCC	6858
Query	1081	CTGTAGGTGCGGCGAGGCGCGTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTGCGAAGCT	1140
Sbjct	6859	CTGTAGGTGCGGCGAGGCGCGTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTGCGAAGCT	6918
Query	1141	GTCTGCGGGGCGAGGCCCTGTTGGTCAACTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCTGCAGCTG	1200
Sbjct	6919	GTCTGCGGGGCGAGGCCCTGTTGGTCAACTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCTGCAGCTG	6978
Query	1201	CATGTGGATAAAGCCGTCAAGTGGCCTTCGAGCCTCACCCTCTGCTTCGGGCTCTGGGA	1260
Sbjct	6979	CATGTGGATAAAGCCGTCAAGTGGCCTTCGAGCCTCACCCTCTGCTTCGGGCTCTGGGA	7038
Query	1261	GCCCAGGTG 1269	
Sbjct	7039	GCCCAGGTG 7047	

Рис. 2. Сравнение нуклеотидной последовательности части гена ЭПО до и после культивирования клеток CHOpe в течение 10 пассажей с референсной последовательностью гена ЭПО человека.
Fig. 2. Comparison of the nucleotide sequence of a fragment of the EPO gene before and after culturing CHOpe cells for 10 passages with the reference sequence of the human EPO gene.

в разведении 1:100 концентрация ДНК составила 0,18 пг/мл, или 972 молекулы. Таким образом, на 1000 клеток CHOpe приходится 972 копии гена ЭПО, или в среднем одна копия на клетку, что соответствует высокой генетической стабильности клеток.

По разработанной нами технологии была получена субстанция рчЭПО [7]. Известно, что физико-химические характеристики ЭПО определяют такие его свойства, как стабильность, активность, фармакокинетические и фармакодинамические характеристики, которые в конечном счете влияют на профиль безопасности и эффективности его применения [14]. Физико-химические свойства субстанции рчЭПО оценивали в соответствии с требованиями, изложенными в Европейской фармакопее¹¹.

По результатам проведенного гель-электрофореза субстанция рчЭПО гомогенна, представлена на электрофореграмме одной ярко выраженной широкой полосой, что свидетельствует об отсутствии примесей олигомерных форм ЭПО. Содержание мономера рчЭПО — не менее 95%. Молекулярная масса субстанции рчЭПО составляет 32–38 кДа, стандарт ЭПО (ООО «Протеиновый контур», Россия) имеет молекулярную массу 33–40 кДа (рис. 3). Молекулярная масса природного ЭПО составляет приблизительно 30,6 кДа, у коммерческих препаратов рчЭПО диапазон значений колеблется между 32 и 45 кДа.

Результаты изoeлектрического фокусирования представлены на рисунке 4. Субстанция рчЭПО содержит 4–5 основных полос в интервале значений pH от 2,8 до 4,15, что характерно для природного ЭПО.

При проведении специфической реакции расщепления трипсином полипептидной цепи ЭПО по остаткам аргинина и лизина профили хроматограмм гидролизатов субстанции рчЭПО и МСО ЭПО по количеству пиков и по времени удерживания должны принципиально совпадать, что и было доказано в результате проведенных исследований (рис. 5, 6).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов была подтверждена подлинность полученной субстанции рчЭПО.

Дальнейшие исследования состояли в определении соотношения изоформного состава субстанции рчЭПО. ЭПО является гетерогенным гликопротеином, его углеводная часть может меняться за счет нескольких вариантов гликозилирования, что и определяет наличие различных изоформ рчЭПО и соответственно различных качественных и количественных характеристик рчЭПО. Результаты анализа, полученные при разделении изоформ рчЭПО с помощью капиллярного электрофореза, представлены на рисунке 7. Базовая линия стабильна, с незначительным дрейфом. Показано, что на электрофореграмме определяется характерное расположение хорошо разделившихся пиков, идентифицированы пики изоформ 1–8. Изоформный состав рчЭПО соответствует изоформному составу МСО ЭПО.

Качественное и количественное распределение пиков изоформ рчЭПО совпало с распределением пиков МСО ЭПО. Содержание изоформ рчЭПО также соответствует требованиям, предъявляемым к ЭПО (табл. 1).

Согласно требованиям Европейской фармакопеи димеры и высокомолекулярные родственные вещества рчЭПО должны элюироваться перед появлением пика ЭПО, при этом общая площадь пиков, элюированных до основного пика, должна составлять не более 2% от общей площади всех пиков¹³. Про-

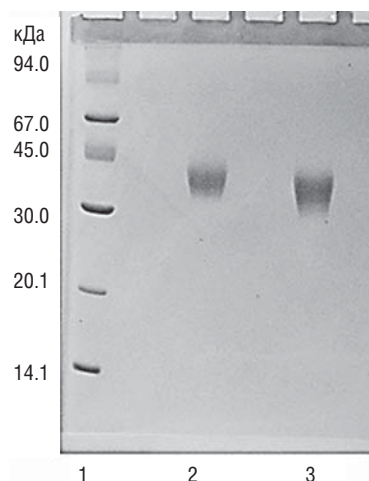


Рис. 3. Электрофореграмма субстанции рчЭПО (электрофорез в ПААГ в невосстанавливающих условиях в присутствии додецилсульфата натрия). (1) набор низкомолекулярных стандартных белков; (2) стандарт ЭПО; (3) рчЭПО.

Fig. 3. Electropherogram of the rhEPO substance (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis under non-reducing conditions). (1) set of low molecular weight reference proteins; (2) EPO reference standard; (3) rhEPO.

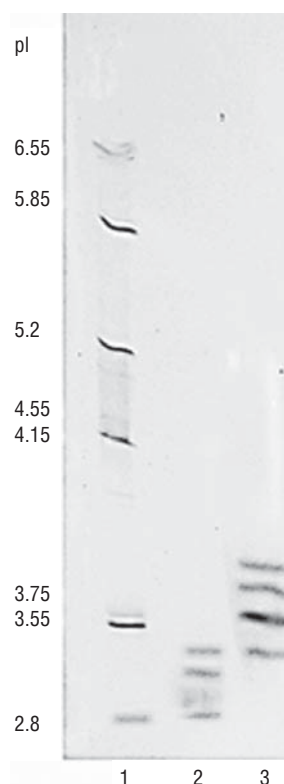


Рис. 4. Изоэлектрофореграмма субстанции рчЭПО. (1) набор pI маркеров; (2) МСО ЭПО; (3) рчЭПО. Анодный раствор — 0,1 М раствор серной кислоты, катодный раствор — 0,1 М раствор натрия гидроксида.

Fig. 4. Isoelectropherogram of the rhEPO substance. (1) set of pI markers; (2) EPO IRS; (3) rhEPO. 0.1 M sulfuric acid and 0.1 M sodium hydroxide were used as anodic and cathodic solutions, respectively.

¹¹ Erythropoietin Concentrated Solution. European Pharmacopoeia 7.0.

¹² Там же.

¹³ Там же.

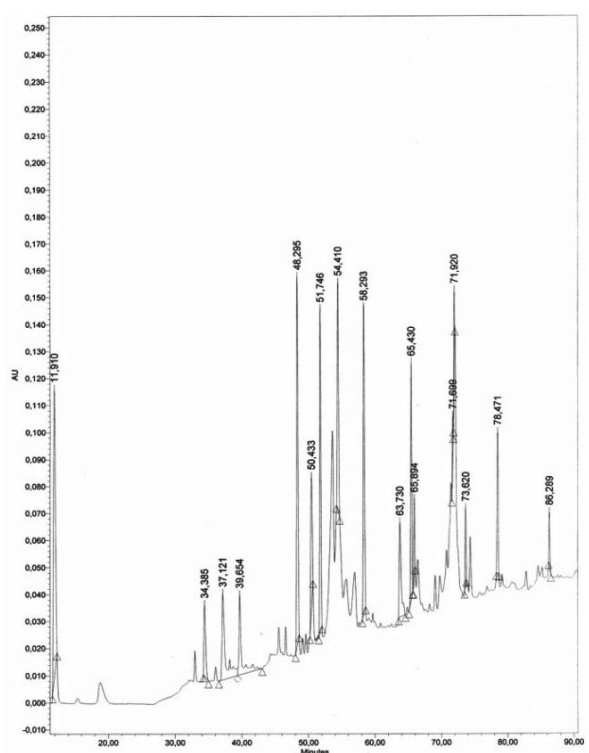


Рис. 5. Хроматограмма гидролизата субстанции рчЭПО. Детектирование: длина волны — 214 нм, объем пробы — 50 мкл, температура колонки — 25 °С.

Fig. 5. Chromatogram of the rhEPO hydrolysate. Detection: wavelength, 214 nm; injection volume, 50 μ L; column temperature, 25 °C.

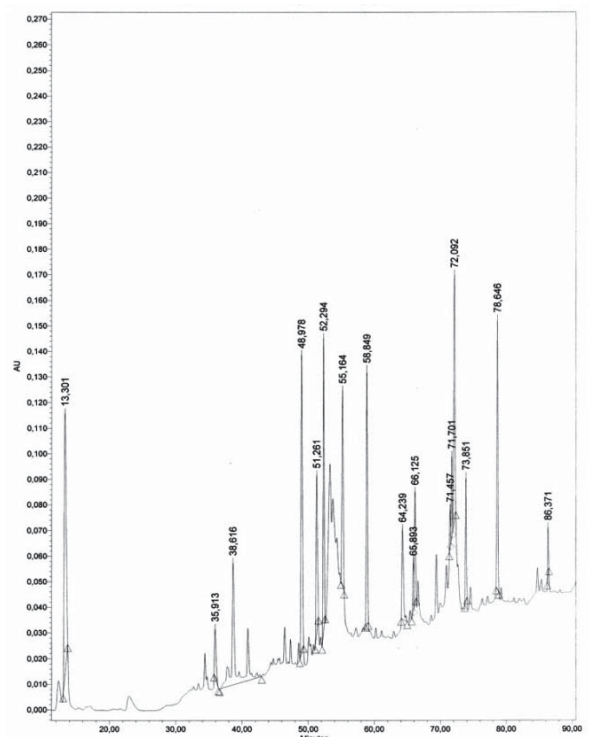


Рис. 6. Хроматограмма гидролизата МСО ЭПО. Детектирование: длина волны — 214 нм, объем пробы — 50 мкл, температура колонки — 25 °С.

Fig. 6. Chromatogram of the EPO IRS hydrolysate. Detection: wavelength, 214 nm; injection volume, 50 μ L; column temperature, 25 °C.

фили элюции, полученные в результате гель-фильтрации субстанции рчЭПО, представлены на рисунке 8.

Показано, что субстанция рчЭПО имеет чистоту 98–99%. Димеры и высокомолекулярные родственные вещества составляют менее 0,5%. Получение рчЭПО на основе перевиваемой культуры клеток должно быть основано на технологии, обеспечивающей высокую степень очистки от клеточных компонентов. Одним из критериев чистоты рчЭПО является отсутствие посторонних примесей, в частности остаточной ДНК клеток CHO⁺. Установлено, что отношение оптической плотности растворов для субстанции рчЭПО составляет 1,51–1,62 при критерии приемлемости более 1,5.

Особая роль в биологической активности ЭПО принадлежит сиаловым кислотам, которые являются терминальными остатками в олигосахаридах, связанными в качестве простетической группы с полипептидной цепью молекулы ЭПО, и обуславливают кислотные свойства гликопротеида. Количество сиаловых остатков в молекулах ЭПО неоднородно и может достигать 14, что составляет около 17% от всех углеводных компонентов в составе ЭПО [15, 16]. Количество сиаловых кислот (в пересчете на N-ацетилглюкозаминную кислоту) на 1 моль ЭПО должно составлять не менее 10 моль/1 моль. В результате проведенных исследований было установлено, что содержание сиаловых кислот в 1 моль субстанции рчЭПО соответствует требованиям, предъявляемым к ЭПО (табл. 2).

Концентрация рчЭПО в субстанции, определяемая методом иммуноферментного анализа, составляла 115000 ± 25000 МЕ/мл.

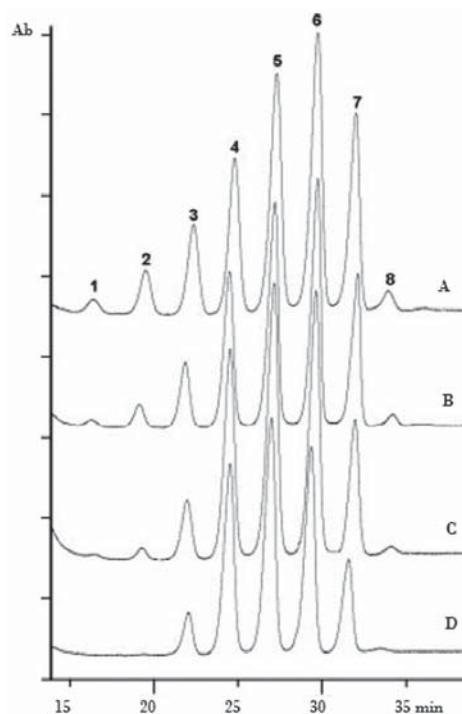


Рис. 7. Электрофореграмма субстанции рчЭПО. (А) МСО ЭПО, (В–Д) рчЭПО. Буферный раствор: 0,01 М раствор трицина, 0,01 М раствор натрия хлорида, 0,01 М раствор натрия ацетата, 7 М раствор мочевины, 2,5 мМ раствор путресцина. Детектирование: длина волны 214 нм. Длина капилляра — 70 см, объем пробы — 50 мкл, температура — 35 °С.

Fig. 7. Electropherogram of rhEPO. (A) EPO IRS, (B–D) rhEPO. Buffer solution: 0.01 M tricine, 0.01 M sodium chloride, 0.01 M sodium acetate, 7 M urea, 2.5 mM putrescine. Detection at 214 nm. Capillary, 70 cm; injection volume, 50 μ L, temperature, 35 °C.

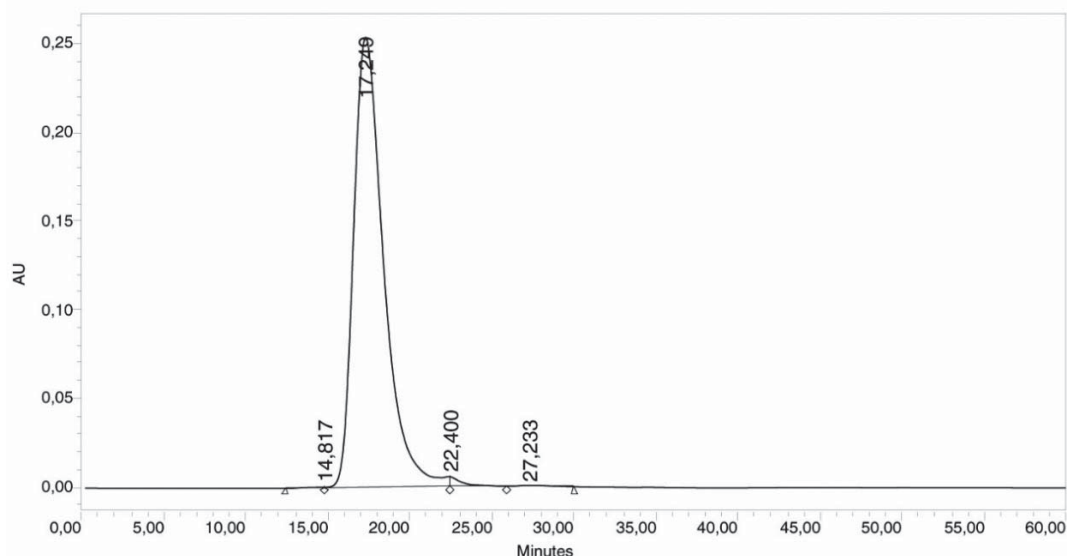


Рис. 8. Хроматограмма субстанции рчЭПО. Нагрузка на колонку — 20–30 мкг белка. Подвижная фаза — фосфатно-солевой буферный раствор (рН 7,2). Скорость потока — 0,5 мл/мин. Детектирование: длина волны 214 нм, длительность хроматографирования не менее 1 ч.

Fig. 8. Chromatogram of rhEPO. Column load, 20–30 µg of protein. Mobile phase: phosphate-buffered saline, pH 7.2. Flow rate, 0.5 mL/min. Detection: wavelength, 214 nm; run time, not less than 1 hour.

Таблица 1. Содержание изоформ субстанции рчЭПО

Table 1. The content of rhEPO isoforms

Изоформы Isoforms	Содержание рчЭПО, % Content of rhEPO, %	Содержание МСО ЭПО, % Content of EPO IRS, %	Требования Европейской фармакопеи ¹² , содержание ЭПО, % Requirements of the European Pharmacopoeia ¹² , EPO content, %
1	Не более 5 Not more than 5	Не более 5 Not more than 5	0–15
2	Не более 5 Not more than 5	Не более 5 Not more than 5	0–15
3	9–10	10–12	1–20
4	15–20	15–20	10–35
5	10–15	10–15	15–40
6	30–33	34–35	10–35
7	20–23	23–25	5–25
8	Не более 5 Not more than 5	Не более 5 Not more than 5	0–15

Таблица 2. Определение сиаловых кислот в субстанции рчЭПО

Table 2. Determination of sialic acids in rhEPO

Наименование пробы Sample	Концентрация раствора N-ацетилнейраминной кислоты, мкг/мл N-acetylneuraminic acid solution concentration, µg/mL	Оптическая плотность (OD ₅₈₀) Absorbance (OD ₅₈₀)	Содержание сиаловых кислот, мкг Sialic acid content, µg	Среднее значение содержания сиаловых кислот, мкг Mean sialic acid content, µg	Количество молей сиаловых кислот на 1 моль рчЭПО и МСО ЭПО Moles of sialic acid per mole of rhEPO and EPO IRS
рчЭПО rhEPO	300	0,038	4,2	4,1	13,75
		0,036	4,0		
		0,038	4,2		
	150	0,021	2,1	2,2	
		0,023	2,3		
		0,021	2,1		
МСО ЭПО EPO IRS	300	0,030	3,2	3,5	11,2
		0,033	3,5		
		0,034	3,7		
	150	0,018	1,9	1,8	
		0,017	1,8		
		0,015	1,6		

Заключение

В результате исследований охарактеризована субстанция рчЭПО, полученная на основе штамма-продуцента CHOpe, в соответствии с требованиями, предъявляемыми к ЭПО. Подтверждена генетическая стабильность штамма-продуцента CHOpe, доказана идентичность аминокислотной последовательности ЭПО. На основе штамма-продуцента получена субстанция рчЭПО. Проведены исследования физико-химических свойств субстанции. Показано, что субстанция рчЭПО гомогенна и не содержит примесей олигомерных форм ЭПО, димеры и высокомолекулярные родственные вещества составляют менее 0,5%, молекулярная масса находится в узком диапазоне от 32 до 38 кДа. Изoeлектрическая точка — от 2,8 до 4,15. Идентифицированы пики изоформ 1–8, изоформный состав субстанции рчЭПО соответствует изоформному составу ЭПО. В 1 моль субстанции рчЭПО содержится 13,75 моль сиаловых кислот. Концентрация рчЭПО составляет 115000 МЕ/мл.

Вклад авторов. И. Ф. Радаева — получение данных по выделению и характеристике физико-химических показателей субстанции рчЭПО, анализ результатов, написание текста статьи; В. А. Терновой — исследование экспрессирующей конструкции штамма-продуцента CHOpe, анализ и оформление полученных результатов; А. О. Семенова — исследование экспрессирующей конструкции штамма-продуцента CHOpe, анализ и оформление полученных результатов; Н. Б. Думченко — получение данных по выделению субстанции рчЭПО, анализ результатов; Е. А. Нечаева — разработка дизайна исследования, написание текста статьи.

Authors' contributions. Irina F. Radaeva—obtaining data on the isolation of the rhEPO substance and characterisation of its physico-chemical properties, analysis of the results, writing the text of the article; Vladimir A. Ternovoy—study of the expression construct of the CHOpe producer strain, analysis and presentation of the results; Aleksandra O. Sementsova—study of the expression construct of the CHOpe producer strain, analysis and presentation of the results; Natalya B. Dumchenko—obtaining data on the isolation of the rhEPO substance, analysis of the results; Elena A. Nechaeva—elaboration of the research design, writing the text of the article.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература/References

1. Melli G, Jack C, Lambrinos GL, Ringkamp M, Höke A. Erythropoietin protects sensory axons against paclitaxel-induced distal degeneration. *Neurobiol Dis.* 2006;24(3):525–30. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.08.014>
2. Lisowska KA, Bryl E, Witkowski JM. Erythropoietin receptor is detectable on peripheral blood lymphocytes and its expression increases in activated T lymphocytes. *Haematologica.* 2011;96(3):e12–e13. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.038414>
3. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood.* 2003;102(4):1340–6. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-01-0223>
4. Savino C, Pedotti R, Baggi F, Ubiali F, Gallo B, Nava S, et al. Delayed administration of erythropoietin and its non-erythro-

- poietic derivatives ameliorates chronic murine autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2006;172(1–2):27–37. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.10.016>
5. Киприянов СМ, Царева АА, Офицеров ВИ, Хромых ТИ, Сандахчиев ЛС. Рекомбинантная плазмидная ДНК pSV-dEp-poly-NeO, кодирующая эритропоэтин человека, штамм культивируемых клеток яичника китайского хомячка CHOpe — продуцент эритропоэтина человека. Патент Российской Федерации № 2070931; 1996. [Kipriyanov SM, Tsareva AA, Ofitserov VI, Khromykh TI, Sandakhchiev LS. Recombinant plasmid DNA pSV-dEp-poly-NeO encoding human erythropoietin, strain of Chinese hamster ovary cultured cell CHOpe — a producer of human erythropoietin. Patent of the Russian Federation No. 2070931; 1996 (In Russ.)]
 6. Радаева ИФ, Богрянцева МП, Нечаева ЕА. Банки культур клеток для биотехнологии. *Клеточные технологии в биологии и медицине.* 2012;(2):110–5. [Radaeva IF, Bogryanceva MP, Nechaeva EA. Cell Culture Banks for Biotechnology. *Kletochnye tekhnologii v biologii i medicine = Cell Technologies in Biology and Medicine.* 2012;(2):110–5 (In Russ.)]
 7. Радаева ИФ, Колесова МЕ, Сереброва ВС, Вараксин НА, Рябичева ТГ, Жилина НВ и др. Разработка технологии получения лиофилизированной субстанции рекомбинантного эритропоэтина человека. *Биотехнология.* 2013;29(2):67–73. [Radaeva IF, Kolesova ME, Serebrova VS, Varaksin NA, Ryabicheva TG, Zhilina NV, et al. Development of technology for production of recombinant human erythropoietin freeze-dried substance. *Biotechnologiya = Biotechnology.* 2013;29(2):67–73 (In Russ.)]
 8. Сандахчиев ЛС, Колокольцова ТД, Костина НЕ, Нечаева ЕА, Юрченко НД, Рыжиков АБ и др. Таблетированная форма рекомбинантного человеческого эритропоэтина для перорального применения и способ ее получения. Патент Российской Федерации № 2152206; 2000. [Sandakhchiev LS, Kolokoltsova TD, Kostina NE, Nechaeva EA, Yurchenko ND, Ryzhikov AB, et al. Tableted form of recombinant human erythropoietin for oral use and method of its preparing. Patent of the Russian Federation No. 2152206; 2000 (In Russ.)]
 9. Ханисов ВВ, Тритэк ВС, Акапов АБ, Буркитбаева СС, Джунушалиева ЧУ, Хасенбекова ЖР и др. Влияние субстанции рекомбинантного человеческого эритропоэтина на гематологические показатели в периферической крови. *Биотехнология. Теория и практика.* 2007;(2):101–8. [Hanisov VV, Tritek VS, Akapov AB, Burkitbaeva SS, Dzhunushalieva ChU, Hasenbekova ZhR, et al. The effect of the substance of recombinant human erythropoietin on hematological parameters in peripheral blood. *Biotechnologiya. Teoriya i praktika = Biotechnology. Theory and Practice.* 2007;(2):101–8 (In Russ.)]
 10. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74(12):5463–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
 11. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82(22):7580–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.22.7580>
 12. Малыгина ВС, Радаева ИФ, Нечаева ЕА, Дроздов ИГ. Изучение свойств культуры клеток CHOpe — продуцента эритропоэтина человека. *Биотехнология.* 2010;2:31–5. [Malygina VS, Radaeva IF, Nechaeva EA, Drozdov IG. Characteristics of a cell culture CHO-pe, a producer of human erythropoietin. *Biotechnologiya = Biotechnology.* 2010;2:31–5 (In Russ.)]
 13. Nunberg JH, Kaufman RJ, Schimke RT, Urlaub G, Chasin LA. Amplified dihydrofolate reductase genes are localized to a homogeneously staining region of a single chromosome in a methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cell line. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978;75(11):5553–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.11.5553>

14. Меркулов ВА, Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Алпатова НА, Гайдерова ЛА, Яковлев АК и др. Препараты рекомбинантных эритропоэтинов и их характеристики. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2013;(3):4–11. [Merkulov VA, Soldatov AA, Avdeeva ZhI, Alpatova NA, Gayderova LA, Yakovlev AK, et al. Recombinant erythropoietin preparations and their characteristics. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2013;(3):4–11 (In Russ.)]
15. Яковлев АК, Алешкин АВ, Меркулов ВА, Бондарев ВП. Совершенствование методики определения специфической активности эритропоэтина. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018;63(7):422–8. [Yakovlev AK, Aleshkin AV, Merkulov VA, Bondarev VP. Improvement of erythropoietin bioassay. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* = *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2018;63(7):422–8 (In Russ.)]
16. Яковлев АК, Волкова РА, Симутенко ЛВ, Постнова ЕЛ, Батуашвили ТА, Воропаев АА и др. Разработка отраслевого стандартного образца специфической активности эритропоэтина. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;52(1):60–4. [Yakovlev AK, Volkova RA, Simutenko LV, Postnova EL, Batuashevili TA, Voropaev AA, et al. Development of industrial reference sample of the specific activity of erythropoietin. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal* = *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(1):60–4 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2018-52-1-60-64>

Об авторах / Authors

Радаева Ирина Федоровна. Irina F. Radaeva. **SPIN-код РИНЦ:** 9236-9671

Терновой Владимир Александрович, канд. биол. наук. Vladimir A. Ternovoy, Cand. Sci. (Biol.). **SPIN-код РИНЦ:** 1328-5960

Семенцова Александра Олеговна. Aleksandra O. Sementsova. **SPIN-код РИНЦ:** 3387-9642

Думченко Наталья Борисовна. Natalya B. Dumchenko. **SPIN-код РИНЦ:** 2566-8337

Нечаева Елена Августовна, канд. мед. наук. Elena A. Nechaeva, Cand. Sci. (Med.). **SPIN-код РИНЦ:** 9270-8888

Поступила 16.01.2020

После доработки 15.05.2020

Принята к публикации 27.05.2020

Received 16 January 2020

Revised 15 May 2020

Accepted 27 May 2020