

**Секретия рекомбинантного хорионического гонадотропина человека:
сравнение эффективности IRES риновируса человека и вируса
энцефаломиокардита (EMCV IRES)**

Научный руководитель – Орлова Надежда Александровна

Стронина Дарья Олеговна

Студент (магистр)

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»

РАН», Москва, Россия

E-mail: dariastronina@gmail.com

Внутренний сайт связывания рибосом (IRES) вируса энцефаломиокардита лошадей (EMCV) является широко применяемым РНК-элементом, используемым для ко-экспрессии нескольких белков или их субъединиц в культивируемых клетках животных. Включение этого элемента в бицистронные или олигоцистронные матричные РНК (мРНК) обеспечивает высокий уровень трансляции, независимой от кэп-структуры. Хотя известны IRES-элементы других вирусов, способные реиницировать трансляцию с высокой эффективностью, их потенциал для инициации трансляции фармацевтически значимых белков, за исключением антител, изучен недостаточно. Мы предположили, что IRES риновируса человека типа 89 может обеспечить реинициацию трансляции α -цепи гликопротеиновых гормонов человека на уровне, сопоставимом или даже превосходящем стандартный IRES EMCV. При этом трицистронная мРНК с таким IRES будет лишена длинного прямого повтора в области второго IRES EMCV, который необходим для трансляции селекционного маркера дигидрофолатредуктазы мыши (DHFR).

Была создана генетическая конструкция для экспрессии цепей хорионического гонадотропина человека (ХГч), в которой IRES для α -цепи был заменен на последовательность риновируса человека типа 89, а IRES для селекционного маркера DHFR — на аттенуированный IRES EMCV. Концентрацию гетеродимерного ХГч определяли с помощью ИФА, а содержание α - и β -цепей в гетеродимерной и свободной формах анализировали методом вестерн-блоттинга.

Клетки линии CHO 4BGD трансфицировали исследуемой плазмидой. После первичной селекции стабильно трансфицированных клеток и одного раунда геномной амплификации метотрексатом измеряли содержание гетеродимера и свободных цепей гормона в культуральной среде. Вестерн-блоттинг показал, что α -цепь обнаруживалась только в форме гетеродимера, тогда как β -цепь присутствовала как в свободной форме, так и в составе гетеродимера. Удельная продуктивность по гетеродимеру ХГч для клеточных популяций с плазмидами, содержащими IRES EMCV и IRES риновируса, была практически одинаковой: 1,7 пг/клетка для варианта с IRES риновируса и 1,2 пг/клетка для варианта с IRES EMCV. Отношение уровня свободной β -цепи к гетеродимеру составило $4,78 \pm 1,50$ для плазмиды с риновирусным IRES и $4,53 \pm 1,02$ для плазмиды с IRES EMCV, что соответствует уровням реинициации трансляции 17% и 19% соответственно. Эти различия не являются статистически значимыми.

Результаты исследования показали, что использование IRES риновируса человека не увеличивает титр гетеродимера по сравнению с IRES EMCV, но обеспечивает аналогичный уровень экспрессии. Это делает возможным применение данной последовательности в создании многоцистронных конструкций для экспрессии фармацевтически значимых белков. Кроме того, исключение длинных прямых повторов IRES EMCV из экспрессионных конструкций повышает их генетическую стабильность при длительных культивациях и

геномной амплификации целевых генов.

Работа поддержана грантом РФФ 25-24-00140