

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов». Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

На правах рукописи

Воробьева Ива Глебовна

**РАЗРАБОТКА МАРКЕРА СЕЛЕКЦИИ И СОРТИНГА ДЛЯ БЫСТРОГО
ПОЛУЧЕНИЯ КЛОНАЛЬНЫХ ЛИНИЙ С ПЛАНИРУЕМОЙ
ПРОДУКТИВНОСТЬЮ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА**

Диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук по специальности

03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Научный руководитель

кандидат биологических наук Шукуров Рахим Рахманкулович

Москва 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ.....	3
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	58
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	66
4.1 Создание химерных конструкций, экспонирующих домены связывающие клетки с носителем на мембране.....	66
4.2 Скрининг и оценка клонов при создании штамма-продуцента инфликсимаба методом предельных разведений	69
4.3 Скрининг клонов при создании стабильной клеточной линии дарбэпоэтина с использованием S\MAR элемента.....	72
4.4 Сорбция клеток на титановых кольцах.....	77
4.5 Сорбция клеток на целлюлозной подложке.....	79
4.7 Сравнение схемы скрининга при использовании химерного сортинга с традиционными методами.....	86
5. ВЫВОДЫ.....	89
6. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	90
7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	91
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	93

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Успехи фундаментальной медицины, биологии и биотехнологии, в последние десятилетия, позволили использовать рекомбинантные белки для таргетной терапии в социально значимых заболеваниях, включая онкологические и аутоиммунные. Полноразмерные моноклональные антитела и другие гликозилированные рекомбинантные белки производятся в клеточных линиях высших эукариот. Технологии разработки клеточной линии, имеют решающее значение для быстрого создания терапевтических продуктов на основе рекомбинантного белка, где скорость и простота отбора высокопродуктивных клеточных линий может значительно снижать затраты на разработку технологий производства биоподобий и инновационной продукции. Коммерческая доступность, сокращение периода выхода на рынок нового рекомбинантного белка или биоподобия по новым технологиям для биофармацевтических производителей может быть критично, потому что это увеличивает прибыль для биопрепаратов с ограниченным сроком патентной защиты. Создание и модификация технологий, направленных на получение устойчивых и высокопродуктивных клеточных линий для крупномасштабного промышленного производства терапевтического белка снижает, в конечном итоге, себестоимость лекарственных белковых продуктов.

Степень разработанности темы исследования

В 1986 году был зарегистрирован первый продуцент, использующий как основу клетки китайского хомячка СНО. Эта технология открыла возможность использования клеток млекопитающих для производства белковых терапевтических продуктов. В настоящее время, СНО являются одной из лучших линий клеток млекопитающих для получения рекомбинантных терапевтических белков по нескольким причинам. Они способны адаптироваться и расти в суспензионной культуре, которая оптимально подходит для промышленного процесса благодаря высокой плотности клеточной суспензии. Клетки СНО безопаснее, чем линии клеток человека, так как вирусы специфичные для линий клеток человека не способны в них размножаться

[1]. Клетки китайского хомячка могут расти в свободных от сыворотки и химически определенных средах, обеспечивающих воспроизводимость процессов в различных партиях продукции. Эти клетки создают необходимые посттрансляционные модификации рекомбинантных белков, которые требуются для их биологической активности и терапевтического эффекта[2]. В частности, гликозилирование рекомбинантных белков [3]. Использование геномной нестабильности клеток СНО позволяет амплифицировать трансгенные последовательности, что, приводит к высокому выходу рекомбинантного белка. В настоящее время, концентрации рекомбинантных белков в культуральной жидкости достигли уровня нескольких граммов на литр, что более чем в 100 раз выше, чем продуктивность клеточных линий в 1980 - х годах. К этому привело развитие технологий создания стабильных и высокопродуктивных линий, использование омиксных технологий для изучения полученных продуцентов и процессов оптимизации, а также оптимизации процесса культивирования. Поэтому, клетки СНО широко применяются для создания терапевтических гликопротеинов [2, 3, 4].

Истечение срока действия патентной защиты, которая предоставляет права на производство биопрепаратов, таких как Avastin/Авастин (бевацизумаб), Herceptin/Герцептин (трастузумаб) и Rituxan[®]/Мабтера[®](ритуксимаб) создает возможность для производства биоподобий [5]. Разработка новых продуктов и создание биоподобий требуют все новые линии клеток, а также новые эффективные технологии, рассчитанные на масштабное производство [6]. В том числе необходим быстрый эффективный отбор стабильных клеточных клонов с высокой производительностью, чтобы снизить себестоимость крупномасштабного производства с помощью оптимизации процессов. Разнообразие клеток в трансфицированного пуле, вызванная случайной интеграцией генов и генной амплификацией снижают избавляясь от непроизводительных клеток и создавая коллекции моноклональных линий, обладающих стабильным генотипом и фенотипом. Это необходимо для воспроизводимой работы линии в производстве. Стабильность и моноклональность линии, подтверждают методом предельных разведений, благодаря этому возможна воспроизводимая работа биореактора, снижение затрат на производство и лучшее качество целевого

белка за счет необходимого, для каждого конкретного белкового продукта, профиля гликозилирования.

Еще одной причиной для получения моноклональных культур клеток, является то, что высокопродуктивные клоны в гетерогенной популяции встречаются редко, зачастую обладают более низкой жизнеспособностью и увеличенным клеточным циклом из-за дополнительной метаболической нагрузки после трансфекции и амплификации генов [7-11]. В тех случаях, где выход рекомбинантного белка важен для коммерческой жизнеспособности продукта [при производстве моноклональных антител], тысячи клонов анализируются, чтобы получить набор производительных моноклонов. Даже при применении современной робототехники, создание производственной линии остается затратным и капиталоемким, и, как правило, требует от 6 до 12 месяцев [9].

Цели и задачи исследования

Основной целью работы было создание нового маркера селекции и сортировки для клеток высших эукариот и оценка возможности быстрого и эффективного отбора клональных клеточных линий с повышенной производительностью рекомбинантного белка. Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Разработка и изготовление конструкций, содержащих варианты селективных маркеров, обеспечивающих адгезию с помощью химерных генов.
2. Оценка возможности дифференцированной селекции на разных вариантах носителя
3. Отбор высокопродуктивных клонов-трансформантов CHO-S на носителе.
4. Характеристика полученных линий по экспрессии гена-маркера
5. Сравнение нового способа отбора с традиционно применяемыми, при создании клеточных линий.

Научная новизна и практическая значимость работы

В ходе работы были получены серии производительных клонов-продуцентов дарбэпоэтина альфа и полноразмерного моноклонального антитела инфликсимаба. Разработан новый протокол простой, эффективной селекции высокопроизводительной клеточной линии. Получена коллекция стабильных клеточных линий с высоким уровнем экспрессии модельного белка, для использования как основы для целевой интеграции при контролируемой вставке трансгена. Созданы генетические конструкции, усиливающие адгезию клеток-реципиентов на носителях, содержащих целлюлозу, что может применяться при культивировании на носителе. Создан новый маркер селекции и сортировки для интегрированных в геном конструкций. Модифицирована, и испытана система дифференцированной селекции на основе технологии «r-hook». Проведено сравнение скорости отбора производительной линии при вариантах селективного маркера. Конструкции, содержащие S\MAR элементы – приводили к повышению средней производительности и снижению гетерогенности отобранных клонов, и селекции на целлюлозной подложке, при которой клетка с эффективной экспрессией трансгенной кассеты может образовывать колонии и отбираться без контаминации клетками исходного штамма или непроизводительными линиями. Проведено сравнение скорости отбора клеточных линий с 2 разными селективными маркерами, которое показало сокращение временных затрат и расходных материалов в два и более раз.

Методология и методы исследования

Методологической основой исследования являлись работы в области молекулярных основ клеточного дисплея, фенотипических проявлений инсерционного мутагенеза в клетках высших эукариот, изучения свойств химерных трансмембранных инженерных белков. Настоящая работа направлена на изучение молекулярных механизмов селекции и сортировки клеток с необходимыми свойствами. В работе использовались молекулярно-генетические методы, методы клеточной инженерии, количественные и качественные методы оценки экспрессии генов: иммуноферментный анализ, проточная цитометрия, методы визуализации экспрессии исследуемых генов. Результаты, полученные в ходе исследования, регистрировались и статистически обрабатывались.

Степень достоверности и апробация результатов

В работе использованы современные методы молекулярной биологии и биотехнологии. Материалы диссертации изложены полно и опубликованы в следующих печатных работах:

1. Р.Р.Шукуров, Н.В. Лобанова, И.Н.Савинова, И.Г.Воробьева, А.А.Нурбаков, Л.В.Ермолина, Н.В.Орлова, А.Г.Мосина, Л.П.Антонова, Р.А.Хамитов, Ю.А.Серегин. Создание стабильной клеточной линии — продуцента рекомбинантного дарбэпоэтина-альфа на основе клеток CHO. Биотехнология, 2013, № 2, С. 46-54

2. R.R.Shukurov, N.V.Lobanova, I. N.Savinova, I. G.Vorobyova, A.A.Nurbakov, L.V. Ermolina, N.V.Orlova, A.G.Mosina, L.P.Antonova, R.A.Khamitov, and Yu.A.Seryogin “Design of a stable cell line producing recombinant darbepoetin alpha based on CHO cells”. «Прикладная биохимия и микробиология», 2014, Т. 50, № 9, С. 812-818

3. И.Г.Воробьева, Р.Р.Шукуров, Ю.А.Серегин, Смирнова Е.А.Создание штамма-продуцента моноклонального антитела инфликсимаб на основе линии клеток CHO. Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. 2013. Т. 8. № 4. С. 85-89.

4. И.Г. Воробьева, Р.Р. Шукуров, Д.Г.Козлов, Т.Б.Корягина, Н.В.Антипова, В.Н.Степаненко. Модификация системы, основанной на применении маркеров селекции и сортирования, для отбора стабильных трансфектантов Биотехнология, 2018, Т. 34, № 2, С.9 – 17

5. Modification of a System Based on the Use of Selection and Sorting Markers for the Screening of Stable Transfectants. I.G. Vorobyova, R.R. Shukurov, N.V. Antipova, V.N. Stepanenko. «Прикладная биохимия и микробиология», 2018, Т. 54, № 9, 842-848

И тезисах конференций:

1. Shukurov R., Savinova I., Kazachenko K., Lobanova N., Vorobyeva I., Seregin Y. Enhanced control of recombinant IgG expression in CHO cells by genetic construct with heavy chain and selection marker separated by IRES element. Abstracts of the Protein and Antibody Engineering Summit (PEGS 2012), Vienna, Austria, 6-8 November 2012, C- 24

2. Rahim Shukurov, Irina Savinova, Iva Vorobyeva, Yury Seregin. Medium optimization improves glycosylation profile of recombinant darbepoetin alfa in CHO cells. Abstracts of the Protein and Antibody Engineering Summit (PEGS 2013), Lisbon, Portugal, 4-8 November 2013, с- 159.
3. Enhanced control of recombinant Igg expression in CHO cells by genetic construct with heavy chain and selection marker separated by ires element. «БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ И МЕДИЦИНА» Москва, Март 19-22, 2013, с- 159.
4. Болотова А.А., Воробьева И.Г., Павленко Д.М., Корягина Т.Б., Степаненко В.Н. Создание клеточной линии продуцента фолликулостимулирующего гормона человека при использовании технологии Crispr/Cas9. XXIX Зимняя молодежная научная школа «перспективные направления физикохимической биологии и биотехнологии» Москва, 2017 г., 7-10 февраля, С - 113

Объем и структура и диссертации

Диссертация содержит следующие основные разделы: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 180 ссылок. Диссертация изложена на 107 страницах машинописного текста и содержит 12 таблиц и 17 рисунков.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии). Область исследований соответствует пункту 1 специальности 03.01.06 биотехнология (в том числе бионанотехнологии) - генетические, селекционные и иммунологические исследования в прикладной микробиологии, вирусологии и цитологии и пункту 9 - технология рекомбинантных ДНК, гибридная технология. Биотехнология животных клеток, иммунная биотехнология.

Положения, выносимые на защиту

1. Созданы химерные гены TiBP-PDGFR и CBD-PDGFR, белковые продукты которых сообщают способность продуцирующим их клеткам связываться с носителями – титаном и целлюлозной подложкой
2. Показана возможность дифференцированной селекции на целлюлозной подложке с помощью маркера CBD-PDGFR
3. Получена серия стабильных продуктивных клональных линий при помощи химерного белка CBD-PDGFR
4. Разработана система дифференцированной селекции и оценена ее эффективность при помощи модельного белка EYFP.
5. Проведено сравнение нового способа отбора с традиционно применяемыми при создании клеточных линий. Показано, что применение созданного химерного CBD-PDGFR-маркера приводит к быстрому отбору высокопродуктивных стабильных клональных линий трансфектантов.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Технологии экспрессии белка. Инженерия вектора экспрессии

Первый шаг в процессе создания трансгенной эукариотической клеточной линии является разработка надежного вектора экспрессии, совместимого с используемой клеткой-хозяином. Транскрипция рекомбинантного гена будет во многом зависеть от силы промотора, системы экспрессии и сайта геномной интеграции вектора. Промотор, энхансер, терминирующая последовательность и жесткость селективного маркера влияют на максимальную экспрессию целевого гена, хотя степень вклада от каждого компонента может быть разной в каждом конкретном случае [12]. Производительность клеточной культуры, нормированная на титр клеток, будет зависеть от транскрипционной активности промотора, соэкспрессии генов продукта и маркера селекции, подбора строгости маркеров селекции, регуляторных элементов ДНК, используемых в инженерной кассете вектора, и интеграции этой кассеты в определенные сайты генома клетки - хозяина. Кроме того, использование различных элементов геномной ДНК, усиливающих экспрессию целевой последовательности, например, усиливающие экспрессию элементы последовательности – EASE, скаффолд и матрикс связывающие области - S/MAR элементы. Производительность также может быть увеличена за счет улучшения характеристик клеточной культуры технологиями инженерии клеточной линии.

2.2 Сравнение промоторов, используемых в кассетах для эукариотических экспрессионных систем

Подбор промотора для интегрируемой кассеты в эукариотической системе один из важнейших этапов для получения линии с высокой экспрессией трансгена. Сила промотора, наличие энхансеров, подверженность промотора метилированию, соотношение сил промотора и/или IRES элемента в бицистронной системе для белков, состоящих из нескольких субъединиц, может свести на нет или минимизировать

вклад остальных элементов системы [12, 13]. Транскрипционные факторы могут варьироваться в ядрах эукариотических клеток на разных стадиях клеточного цикла и дифференцировки, таким образом, окружение трансгена внутри ядра будет по-разному влиять на продуктивность [14]. Для экспрессии рекомбинантного белка в культивируемых эукариотических клетках, есть несколько промоторов, с которых возможно стабильное высокое считывание транскрипта. Промоторы, полученные от генов, кодирующих: бета-актин, фактор элонгации 1A[IF1 α], убиквитина, вирусных частиц (широко используемый промотор цитомегаловируса CMV и промотор/энхансер обезьяньего вируса 40 [SV40]) – успешно используются в клетках-хозяевах высших эукариот [15]. Сравнение активности основных промоторов для эукариотических систем экспрессии приведено (Таблица 1) по материалам статьи [16].

Таблица 1 - Сравнение активности промоторов применяемых для производства рекомбинантного белка в клетках млекопитающих

Область промотора	Активность промотора(% от экспрессии eGFP считываемой с CMV промотора) стабильная трансфекция
CMV	1
CMV модифицированный	2,08
CMV+ Enhancer-1	2,48
EF-1 α	1,71
CAG	1,55

Многие из этих промоторов были изменены путем добавления различных энхансеров или интронных последовательностей элементов, для повышения стабильности и производительности. Другой вид промоторов - композитные промоторы, созданные синтезом двух или нескольких регуляторных последовательностей и/или промотора и энхансера. Последний тип - синтетические промоторы, для их изготовления применяли библиотеки, содержащие большой массив сайтов связывания

транскрипционных факторов [12]. Создание синтетического промотора может быть необходимо с учетом конкретного белка, для определенного типа клеток или определенной особенности клеточной линии. Такой подход зависит от нескольких параметров, в том числе наличие хорошо продуманной библиотеки и эффективного высокопроизводительного процесса отбора [17]. Геномные ДНК – последовательности S\MAR служат в качестве инсуляторов, которые облегчают разворачивание структуры хроматина в ядерной матрице во время интерфазы – блокируя негативное влияние соседнего хроматина[19].

2.3 Последовательность ДНК, к которой присоединяется ядерный скелет клетки, поддерживает транскрипционно активную структуру хроматина

Количество рекомбинантного белка производимого клеткой, кроме конструкции самой кассеты, зависит также от места на хромосоме куда встроится кассета – сайта геномной интеграции. Если этот участок в состоянии гиперацетилирования на протяжении всего клеточного цикла – считывание кассеты практически не будет происходить даже при очень удачной комбинации элементов. Чтобы уменьшить влияние неудачного для трансгенной экспрессии хромосомного окружения кассету фланкируют элементами влияющими на хроматин. Поддерживая активную структуру хроматина, создавая свободные для считывания петли, такие элементы (S/MAR) влияют на гиперацетилирование гистонов, деметилируют трансгенную ДНК и делают ее доступной для транскрипционного комплекса [20, 21]. (Рисунок 1)

Кроме моделирования хроматина, MAR элементы также служат в качестве сайтов связывания для факторов транскрипции, таких как СССТС связывающий фактор [CTCF], и ядерных матричных белков [NMP], чтобы увеличить экспрессию гена [23, 24, 25]. При использовании в качестве элементов действующих на той же цепи считываемой ДНК, или фланкирующих трансген последовательностей S\MAR (человеческого β -глобина, куриного лизоцима или β -интерферона) было показано, что усиливается экспрессия генов в области действия этих последовательно-

стей, что увеличивает вероятность возникновения высокопродуктивных клонов [23, 26, 27, 28].

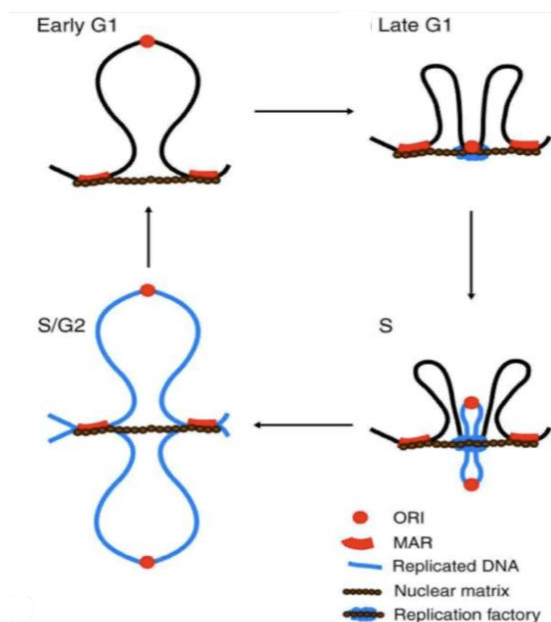


Рисунок 1 - G1, S, G2 – фазы клеточного цикла. S/MAR последовательности ДНК связываются с ядерной матрицей. В конце G1 начало репликации (ORI) и связанные с ним факторы репликации собираются в ядерной матрице. Когда клетка входит в фазу S, реплицированная ДНК диссоциирует от ядерной матрицы (синий цвет), в то время как остальная ДНК в репликациях продолжает воспроизводиться. В конце S-фазы реплицированная ДНК полностью диссоциирует от ядерной матрицы. Оригинал представлен:

<https://www.researchgate.net/publication/47405799> Characterization of the *Drosophila* Scaffold Attachment Factor B SAFB

Использование элементов ремоделирования хроматина может в сотни раз сократить количество клонов с незначительным производством целевого белка, значительно увеличивая долю производительных клеток в выборке тем самым упрощая скрининг. В дополнение к выбору промотора, энхансера и геномных ДНК элементов, используемых в векторе, порядок, направление действия и расстояние между составными частями конструкции могут оказать существенное влияние на производительность рекомбинантного белка клеткой-хозяином. Кооперативные эффекты транс-

крипционных факторов будут зависеть от позиции каждого сайта, необходимого для комплекса инициации транскрипции [29]. Поскольку делеция S/MAR последовательностей может как уменьшить, так и увеличить транскрипцию соседних генов, предполагается, что они, как изоляторы, могут быть и негативными регуляторами для хроматина [30]. В большинстве же случаев, использование таких элементов в экспрессирующих векторах создает пул трансфицированных стабильных клеток с улучшенными уровнями экспрессии, ограниченной разницей в производительности между отдельными клетками пула [31], благодаря способности элементов S/MAR защищать трансген при интеграции в геном от транскрипционно репрессивного влияния окружения - ДНК – изоляторов и гетерохроматинизации [32]. По некоторым исследованиям векторы, которые фланкированы только с одной стороны кассеты и содержат S/MAR в 5' области кассеты, показывают лучшую производительность рекомбинантного белка в клеточных линиях CHO, по сравнению с векторами с S/MAR на 3' границе генно-инженерной конструкции [31]. Это соответствует результатам других исследований с использованием ретровирусных векторов и S/MAR, полученных из гена IFN β человека [33] и показывают способность S/MAR увеличивать количество транскрипта целевого гена в зависимости от расстояния до его промотора и энхансеров. Важность расстояния между расплетающимися элементами и другими регуляторными элементами в векторе и различное влияние S/MAR в зависимости от ориентации относительно целевой ДНК показана в нескольких работах [31, 32]. В исследовании, где такая конструкция интегрирована в геном, разница в экспрессии сравнивали с транзитной трансфекцией при различных позициях элементов S/MAR в векторе, показали что изменение активности для каждого варианта сохранялось. Основа механизма влияния ориентации S/MAR элементов на активность может быть связана с различиями в структурировании хроматином расположенной рядом последовательности ДНК [34]. Цепь ДНК может расплетаться в зависимости от GC состава с одной или с другой стороны от этих элементов, так как различные сайты и состав влияют не только на действие расплетающего элемента, но и смещают направление его действия. Для эукариот расплетающее действие наблюдается у стороны цепи с началом репликации транскрипции, где находятся сайты инициации

[35]. Авторы публикации изучили транскрипцию вниз по течению гена, чтобы оценить эффект от удаления элемента S/MAR. Экспрессия, как они показали, часто зависит от направления транскрипционного комплекса относительно ТАТА бокса.

Специальные геномные АТ-богатые последовательности - взаимодействующие с белком SATB1, тесно связаны с ядерным матриксом при помощи петель хроматина [36]. SATB1 был первоначально идентифицирован как протеин, который распознает двухцепочечную ДНК с высокой степенью точности. Сайт связывания этого белка часто присутствует в элементах S/MAR [36]. SATB1 хорошо охарактеризованный MAR-связывающий белок [MBP], исследования показали, что SATB1 может регулировать экспрессию генов *in vivo* путем изменения структуры хроматина, ядерной архитектуры, и эпигенетических профилей целевых последовательностей [37- 38]. SATB1 важен для изменения структуры хроматина, и для поддержания расплетенного участка вокруг необходимых для транскрипции областей, он способствует активной экспрессии целевых генов и считыванию тканеспецифических генов [40]. SATB2, близкий гомолог SATB1, был обнаружен как ген, мутации в котором у человека приводят к синдрому «волчья пасть» [28]. Позже было показано, что элементы S/MAR включаются для координированной экспрессии генов ЦНС, способствуя считыванию этих тканеспецифических генов [41]. Последовательности в элементах S/MAR, например, сайт связывания SATB1, могут влиять на структуру и пространственную организацию соседних последовательностей и, в конечном счете, на экспрессию белка при интеграции в хромосому исходной клеточной линии. Таким образом, наличие S/MAR элементов, физическое положение гена в векторе в относительно них будет значительно влиять на эффективность транскрипции трансгена, и уровень экспрессии целевого рекомбинантного белка.

2.4 Универсальные элементы, открывающие хроматин

Инсуляторы, или универсальные элементы, открывающие хроматин [UCOE], могут также улучшить выход рекомбинантного белка, защищая трансген от инактивации в хроматине по фланкирующим последовательностям. UCOE является барье-

ром для распространения структуры гетерохроматина [28]. Это свободный от островков CpG метилирования, участок ДНК, который снижает позиционные эффекты, зависящие от интеграции вектора, и поддерживает хроматин в «открытой» конфигурации повышая доступность данного участка ДНК для транскрипционной машины [42]. Производство антител в клетках СНО значительно увеличивается при включении USOE в векторы экспрессии [43]. Кроме того, сообщалось, что USOE увеличивает долю высокопроизводительных клонов и, следовательно, повышает экспрессию трансгенного антитела в несколько раз в стабильно трансфицированных пулах СНО [43]. Альтернативный некодирующий GC-богатый ДНК - фрагмент предлагается в качестве нового USOE, так как фланкирование гена интереса GC-богатым фрагментом увеличивает уровень экспрессии и выход рекомбинантного белка [44]. Предполагается, что жесткость GC связей в двойной спирали ДНК способствует образованию вторичной структуры ДНК, которая может влиять на метилирование ДНК и гистонов, изменяя конфигурацию хроматина [45-48].

2.5 Оптимизация кодирующей последовательности по кодам

Сама кодирующая последовательность гена, изменяет экспрессию белка, в том числе на уровень мРНК, скорость транскрипции, эффективность инициации. Каждое из этих воздействий, может быть связано с различными типами и комбинациями элементов последовательности. Так, например, AT-богатые участки внутри гена могут привести к преждевременной терминации транскрипции и уменьшению целевой мРНК. Устойчивая структура мРНК вблизи сайта связывания рибосомы может снизить инициацию трансляции, а кластеры редких кодонов внутри кодирующей мРНК могут привести к остановке рибосомы [49]. Элементы кодирующей последовательности как снижают, так и повышают экспрессию белка. Любая конкретная замена в последовательности - например, замена одного кодона на другой, кодирующий такую же аминокислоту, обязательно будет отражаться на частоте использования кодонов, нуклеотидном составе, структуре мРНК, а также, иногда, на вариантах сплайсинга последовательности. Если эффект виден на какой-либо одной конкретной за-

мене, это может быть связано с одним фактором или комбинацией нескольких [50]. Взаимодействие этих факторов становится еще более сложным, когда одновременно сделано несколько замен, как в большинстве стратегий оптимизации генов. Комплексный обзор экспрессии генов дикого типа, по сравнению с оптимизированными генами с помощью различных алгоритмов опубликован в 2004 году [50, 51]. В большинстве исследований оптимизация приводила к увеличению уровня экспрессии белка более чем в 1000 раз. Выделить вклад каждой из нескольких переменных в выборке является основной трудностью для исследования оптимизации, а, следовательно, оценить надежность и правильность алгоритмов для проектирования других генов. Кроме того, невозможно показать, что алгоритм достиг лучшего сочетания переменных в последовательности гена, чтобы привести к оптимальному уровню экспрессии. Недавние исследования влияния конструкции генно-инженерной кассеты на экспрессию гетерологичного белка показали, что некоторые из основных принципов проектирования последовательностей существенно не объясняют нестабильность гетерологичной экспрессии белка [51 - 53]. В общем, все факторы, влияющие на экспрессию белка на уровне ДНК или мРНК гена, продолжают изучаться, чтобы получать предсказуемый при оптимизации результат. Примерами являются мотивы РНК – деградации, вторичные структуры мРНК, частота использования кодонов и GC процентный состав. Можно рассмотреть структуру мРНК рядом с сайтом связывания рибосомы гена в качестве контроля. Кроме того, показано, что содержание GC% влияет на экспрессию в конкретных сайтах гена, например, в начале ORF. Варианты последовательностей, важных для гетерологичной экспрессии белка описаны во многих работах [51, 54, 55]. Существует ряд мотивов, которые, как считается, снижают уровень экспрессии гетерологичных белков, и многие алгоритмы оптимизации стремятся исключить их из кодирующей последовательности. Если слишком много «вредных» факторов присутствуют, гены будут экспрессироваться крайне слабо, и невозможно построить статистическую модель. Однако, заменяя слишком много последовательностей на основе теоретических, а не экспериментальных данных, можно серьезно ограничить возможности для анализа. Области кодирующей последовательности, которые обычно исключают:

сайты рибонуклеаз, сайты рекомбинации ДНК, терминаторы транскрипции. Некоторые мотивы зависят от организма - хозяина: внутренние сигналы сплайсинга влияют на экспрессию генов в эукариотических клетках, а Шайна-Дальгарно-подобные последовательности - на гены, экспрессирующиеся в прокариотах. Снижение продукции белка может быть связано с возникновением в трансгене любого кодона, редкого в транскриптоме организма - хозяина. Такие кодоны декодируются тРНК, концентрации которых значительно ниже транспортной РНК часто встречающихся кодонов. Предполагается, что скорость синтеза полипептидной цепи и производство белка снижаются из-за низкой концентрации конкретной тРНК [56]. Благодаря инженерии промышленных штаммов *E. coli*, в которых создали перепроизводство некоторых редких тРНК (штамм Rosetta), была показана улучшенная экспрессия ряда генов с повышенным количеством редких кодонов [57 - 59]. Однако гены с несколькими редкими кодонами могут экспрессироваться на высоком уровне в *E. coli*, без изменения. Это объясняют тем, что общая концентрация тРНК коррелирует со степенью удлинения полипептидной цепи при трансляции, поэтому скорость трансляции может быть ограничена. В некоторых хозяевах, CAI и ТАИ показывают соответствие с уровнями экспрессии природного гена, однако некоторые исследования не поддерживают использование этих индексов, как основных для проектирования уровня экспрессии гетерологичного белка [61-77]. Индексы адаптации и GC%, описываются как неоднозначные. Так, например, два очень разных гена, один из которых содержит смесь часто и редко встречающихся кодонов и другой с использованием исключительно средней частоты кодонов, будут иметь одинаковое значение CAI. Аналогичным образом, GC процент неоднозначно при индивидуальном G%, C%, A% и T% проценте каждого основания в последовательности. Процент G и C оснований, также неоднозначен по отношению к частоте использования кодона. Так как его нельзя изменить, не изменяя аминокислоты, которые кодируются триплетами, оканчивающимися на G/C. В исследовании Кудла и др., была измерена экспрессия библиотеки из 154 последовательностей гена зеленого флуоресцентного белка EGFP, эти последовательности отличались в синонимичных кодонах [56]. Для оценки экспрессии гетерологичных белков, авторы использовали под-

ход, при котором были собраны случайные олигонуклеотиды с образованием последовательности, кодирующей EGFP. Олигонуклеотиды, используемые при синтезе библиотеки были разработаны, чтобы произвести разные варианты в GC% и CAI. При экспрессии в *E. coli*, уровни экспрессии флуоресцентных белков изменялись в 250 раз по всей библиотеке, как было измерено с помощью интенсивности флуоресценции. На основе анализа, авторы пришли к выводу о том, что чаще всего разницу в экспрессии белка можно объяснить шпилькой мРНК вблизи трансляционного начала ORF EGFP. Не было найдено существенной корреляции между экспрессией белка и GC% или CAI, измененных генов. В 2010 году был использован разработанный вариационный подход для создания 285 генов, кодирующих три различных белка [120 + 39 + 126 вариантов генов] [65]. Эти последовательности были сконструированы, чтобы создать образец использования кодонов в соответствии с CAI и GC% на основе естественных для клетки-хозяина, генов. Относительные уровни экспрессии были оценены с использованием клеточных экстрактов, и анализированы по шкале от 0 [нет полосы на геле белка] до 3-х [яркая полоса]. Эти данные были применены для моделирования функции экспрессии. Авторы пришли к выводу о том, что обычно разница экспрессии может быть связана с низким содержанием GC и предсказанной нестабильной структурой мРНК на 5' - конце ORF. Разработанный систематический вариационный подход использовали для создания двух наборов, около 40 вариантов гена, кодирующих одноцепочечное антитело [ScFv] и ДНК-полимеразу [65]. Каждый вариант был синтезирован как независимый ген. Все конструкции были охарактеризованы по относительной экспрессии белка. При синтезе в *E. coli* двух белков ScFv и ДНК – полимеразы, уровень экспрессии полимеразы был выше на два порядка. Авторы отметили, что не наблюдали значительной корреляции между экспрессией гетерологичных белков и CAI. В отличие от исследований Кудла [56], авторы не видели зависимости между экспрессией гетерологичного белка и предсказанной структурой мРНК вблизи 5' области. Это авторы объясняют тем, что последовательности ScFv и транскрипта гена полимеразы показали низкую склонность к образованию структур в этом регионе. Однако, наблюдаемые корреляции уже могут служить основой для надежных алгоритмов проектирования, а также быть

основой направленной стратегии изменения кодирующей последовательности целевых генов для повышения их экспрессии. Показано, как при применении программы DNA2.0 к результатам исследований, может улучшаться дизайн гена для усиленной экспрессии [66]. Регрессионная модель влияния кодонов используется для прогнозирования улучшенных вариантов кодонов и разработки новых оптимизаций генов. Несколько раз было показано значительное повышение экспрессии, при применении предсказанных кодонов. И экспрессия была выше по сравнению с применением индекса адаптации распространенных кодонов [67,68]. Созданные алгоритмы на основе эксперимента с целью оптимизации тысячи генов кишечной палочки и показали сильное повышение продуктивности по сравнению с предыдущими алгоритмами, основанными только на данных анализа генома. Возможность экспрессии синтетических генов, открыли дверь в новую эру ORF инженерии. Каждый образец проектируется, синтезируется и, уровни экспрессии белка оценивают в применяемой в данном случае биологической системе. Полученные данные применяются для построения статистических моделей и/или процесс повторяется, используя знания, полученные при поиске.

2.6 Сайт внутренней посадки рибосомы

Целевой ген и селективный маркер могут соэкспрессироваться путем совместной трансфекции клеток млекопитающих отдельными векторами. Стратегия зависит от эффективности сотрансфекции и надежности экспрессии продукта на основе гена селекции, вероятность чего может быть очень низкой [78]. Экспрессия генов – маркера и продукта и на одном векторе, частично повышает вероятность отбора продуктивной линии [79]. Тем не менее, исследователи сообщают, что использование нескольких промоторов в одном векторе иногда приводит к транскрипционной интерференции - подавлению одного активного блока транскрипционных факторов другим в конструкциях, интегрированных в геном [9]. Чтобы решить эту задачу, обычно применяют IRES элементы. Исследованы и широко используются IRES клеток млекопитающих и/или вирусные [81]. Экспрессия разных элементов генно-

инженерной кассеты, таких как маркер селекции и разные субъединицы трансгенного белкового продукта, могут быть связаны вставкой IRES элемента между последовательностями. Это позволяет все транслируемые части кассеты поставить в зависимость от одного промотора для трансляции с одной мРНК. Последовательности IRES на мРНК обеспечивают 5' - кэп-независимую инициацию трансляции вниз по течению гена, инициация трансляции с 5' части мРНК кэп-зависимая. Есть несколько преимуществ у соэкспрессии белковых продуктов. Один промотор при применении для транскрипции полицистронной мРНК и может обеспечить необходимое для данного целевого белка соотношение экспрессии сцепленных генов [82]. Показано, что такая стратегия успешна для гетеродимерных белков, таких, например, как антитела, уровень экспрессии которых зависит от баланса тяжелых и легких цепей [82, 83]. Зависимость экспрессии маркера селекции от интересующего гена в векторе уменьшает или исключает возникновение в геноме вставок маркеров селекции без целевого гена, которое может произойти из-за фрагментации кассеты [84]. Также сайт посадки рибосомы увеличивает шансы отбора высокопроизводительного клона, даже при использовании амплификации гена [85- 89]. Применение IRES также позволяет получить высокую экспрессию рекомбинантного белка из МТХ амплифицированных пулов клеток, без клональной работы [90].

2.7 Высокопродуктивные системы экспрессии. Система экспрессии искусственная хромосома ACE

ACE [artificial chromosome expression] система экспрессии искусственная хромосома состоит из генно-инженерной хромосомы, основные элементы которой взяты из хромосом млекопитающих, она называется платформа ACE, и целевого вектора ATV, несущего мутантную интегразу для направленной рекомбинации [91, 92]. В платформе ACE находятся повторяющиеся тандемом рибосомные гены и сателлитные последовательности, которые образуют прицентромерный гетерохроматин. Она, также, имеет естественные центромеры и теломеры, чтобы включаться в репликацию ДНК без необходимости интеграции в геном клетки - хозяина, за счет чего снижается

вероятность хромосомных aberrаций и клональная гетерогенность. Благодаря более высокой доле AT базовых пар оснований по отношению к GC парам в нуклеотидном составе платформы ACE, ее очищают с помощью проточного клеточного сортера высокой скорости [93], а затем трансфицируют различным типам клеток. Искусственная хромосома содержит от 50 до 70 акцепторных сайтов рекомбинации, для возможности включать многие копии интересующего гена. После трансфекции, клеточная линия платформы ACE получается при сотрансфекции ATV и интегративной конструкции. Под контролем промотора на интегративной конструкции находится один селективный маркер, пурамицин, а под контролем SV40 промотора на ATV векторе находится второй антибиотик, неомицин. При правильной рекомбинации клетка выживает на средах с двойным селективным агентом. Селективный маркер промотора на ATV путем его интеграции вниз по течению от промотора SV40 в платформе сообщает клетке устойчивость к неомицину. Последовательная трансфекция с различными маркерами селекции может быть осуществлена для насыщения рекомбинации акцепторных сайтов на платформу и, следовательно, высокое число копий интересующего гена может быть достигнуто без амплификации. Как сообщается, с помощью этой системы, высокопродуктивные клоны, отбираются из 100 - 200 выросших на селективной среде моноклонов, и производство антител в таких клеточных линиях достигают уровней выше, чем 500 мг/л в колбах [91]. Рисунок 2 (оригинал рисунка на сайте: http://www.szbk.u-szeged.hu/gen_acstem.php) Ген резистентности к пурамицину отрезается от промотора обезьяньего вируса, и заменяется кодирующей частью гена резистентности неомицина, который в результате рекомбинации становится под контроль промотора SV40. Целевые, трансгенные клеточные линии приобретают устойчивость к неомицину (G418). Среди недостатков системы можно предположить сложности с трансфекцией 2-х объемных целевых векторов. А также, редкое событие гомологичной рекомбинации, целевая трансфекция и сотрансфекция, должны быть поставлены с большим объемом материала и увеличенным расходом трансфицирующего реагента.

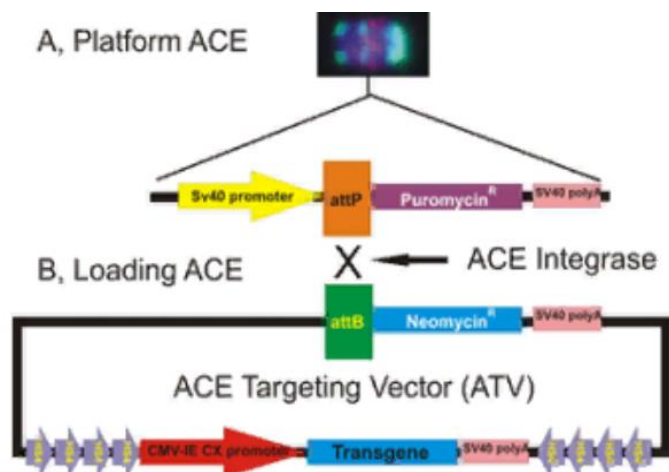


Рисунок 2 - Схема интеграции. Хромосома ACE содержит несколько акцепторных сайтов рекомбинации attP для интегразы ACE. Сайт attP расположен между промотором SV40 и геном резистентности к пурамицину, контролируемым этим промотором. Вектор ATV несет участок рекомбинации attB для интегразы ACE. Ген резистентности к неомицину без промотора сразу после сайта attB. Интеграза ACE катализирует сайт-специфическую рекомбинацию между сайтами attB и attP вектора ATV в хромосомы ACE.

2.8 ВАС система экспрессии

Векторная система экспрессии ВАС применяемых для получения рекомбинантного белка в клетках СНО похожа на платформу искусственная хромосома, векторы ВАС, содержат открытые участки хроматина, сильно увеличивают производство рекомбинантного белка для всех белков, испытанных в исследованиях. ВАС вектора увеличивают производство белка за счет усиления транскрипции целевого гена, таким образом, они не могут предложить значительное преимущество, если экспрессия подавляется на более поздней стадии [т.е. трансляция, фолдинг, транспортировка или секреция]. Векторы ВАС, содержащие активно транскрибируемые гены, могут применяться для экспрессии трансгена от эндогенного тканеспецифичного промотора, приводить к заданным уровням экспрессии. С другой стороны, сочетание векто-

ров ВАС, содержащих открытые регионы хроматина с мощным гетерологичным промотором (CMV, EF1a и др.) приводит к созданию клеточных линий, производящих высокие уровни белка. Уровни экспрессии трансгена, как было показано, в значительной степени зависят от комбинации последовательностей, содержащих элементы открытого хроматина и гетерологичных промоторов. Различные области и сайты промотора с различными контекстами хроматина будут давать заданную экспрессию целевого белка, так как сила промотора может изменяться в широких пределах между различными конструктами и типами клеток [94]. ВАС^{Rosa26} в комбинации с промотором Caggs в качестве вектора экспрессии (Rosa26 – открытая, хорошо экспрессируемая последовательность), позволяют создавать клеточные линии с самыми высокими уровнями экспрессии белка. Положительные эффекты, открытого хроматина *Rosa26* гена не ограничиваются одним конкретным типом клеток или конкретным белком. Благоприятные эффекты были показаны в исследованиях на мышах [95,96], в клетках человека НЕК 293 [97] и в линиях хомячка клеток СНО [98]. При использовании IgG-Fc в качестве модельного белка, показано, что можно получить трансфицированные пулы СНО клеток, продуцирующие 24 РСД в течение трех недель с использованием Caggs: ВАС^{Rosa26} вектора. Единичные клеточные клоны могут производить до 87 РСД. В отличие от челночных векторов без S\MAR элементов [99, 100], производительность на основе ВАС - клонов была прямо пропорциональна числу копий трансгена в клетке - хозяине. Это прямое доказательство, что ВАСs способны преодолеть позиционные эффекты хроматина при стабильной интеграции в геном клетки СНО. Показано также преимущество векторов ВАС в производстве ВИЧ-1 гликопротеиновой оболочки CN54gp140 выход оказался около 1 г/л в культурах с подпиткой с использованием ВАС^{Rosa26} вектора без оптимизации. CN54gp140 является высоко гликозилированным белком, и считается трудно экспрессируемым. ВАС^{Rosa26} вектор обеспечил долгосрочную стабильность линии и оптимальное качество белка. Сложные белки, такие как антитела, могут быть успешно экспрессированы на основе одного ВАС вектора, содержащего две отдельные единицы экспрессии, расположенные в различных местах в пределах последовательности ВАС. Сотранфекция двух векторов ВАС, несущих каждую из поли-

пептидных цепей, еще более выгодна. Это может быть связано с промоторной интерференцией, когда обе единицы экспрессии помещаются в тот же вектор [100], (хотя расстояние составляет 30 кб), и может представлять сложность при производстве антител. Разместив HC и LC от PG9 антитела на одном векторе VAC, исследователи показали, что соотношение между HC и LC может не быть оптимальным для соответствующего антитела [101]. С другой стороны, считывание HC и LC с двух независимых VAC векторов может привести к различному соотношению экспрессии HC/LC в зависимости от количества копий каждого вектора. Возможно, легче найти клоны с соответствующим соотношением HC/LC. Результаты показывают, что экспрессия HC является ограничивающим фактором в производстве PG9 антитела. Тем не менее, использование VAC^{Rosa26} для экспрессии антитела PG9 намного превосходило по производительности обычный вектор, позволило исследователям выделить отдельные клоны клеток с производительностью 57 PCD и более 1 г/л в биореакторе и колбах. Анализ качества производимого PG9 антитела, показал его высокую активность и функциональность. Дополнительные сайты внутри VAC^{Rosa26} вектора, могут быть использованы не только для производства сложных белков, но и одновременной экспрессии полипептидов, для улучшения качества конечного продукта [гликозилирования ферментов], жизнеспособности клеток [анти-апоптотических факторов], клеточного метаболизма, например, MTOR [102], или эффективность секреции, например, ХВР-1 [103]. Потеря производительности при длительном культивировании с большим числом пассажей, является обычным явлением в рекомбинантных линиях СНО, созданных с помощью методов, основанных на случайной интеграции, и это объясняется как потерей числа копий гена, так и эффектами действия эпигенетических инсуляторов [100]. Применение VAC успешно стабилизирует долгосрочную экспрессию белка в отсутствие давления отбора. Это доказывает то, что вектор VAC^{Rosa26} обеспечивает открытую среду хроматина, защищающую целевой белок от глушителей. Авторы публикации наблюдали, что VAC^{Rosa26} интегрируется со средним значением 5,2 относительных копий в стабильных пулах клеток [в пределах от 2,4 до 8,8]. А в VAC^{HPRT} стабильных трансфицированных пулах содержится только 1,9 относительных копии на клон в среднем

[в диапазоне от 0,9 до 3,2] независимо от использования гетерологичного промотора. Применение векторов на основе ВАС генерирует гетерогенную стабильную популяцию с клетками, несущими различные количества копий интегрированных конструкций и, следовательно, различные уровни экспрессии. Поэтому, если цель состоит в том, чтобы исследовать характеристики, активность или функциональность белка, направленная интеграция к активному геномному сайту является подходящим методом, так как он может обеспечить равные уровни экспрессии в различных клеточных клонах. Это осуществляется [104] с помощью системы CRISPR/cas9 [105]. На основе этой технологии идентифицировали геномные транскрибируемые локусы, «горячие точки», в клетках СНО, поддерживающих производительность 13 РСД на одну интеграцию трансгена [106]. Таким образом, ВАС векторы с участками открытого хроматина являются ценными инструментами для производства рекомбинантного белка в клетках млекопитающих, так как создают зависимую только от числа копий трансгена и высокую и стабильную экспрессию. Кроме того, стабильно продуцирующие пулы и отдельные клеточные клоны получают без необходимости амплификации целевого гена в три и шесть недель, соответственно. Векторы экспрессии на основе ВАС обеспечивают альтернативу при создании клеточной линии, но имеют технологическую сложность – эффективность трансфекции больших векторных конструкций. Помимо преимуществ, есть сложности работы при использовании ВАС-системы. Гетерогенная экспрессия ВАС-системы может помочь увеличить общий объем производства белка, то есть снизить процент целевого белка при выделении. Также, это размер ВАС: большие геномные последовательности присутствуют в ВАС в качестве разрешающей среды для гена интереса. Однако большой размер ВАС является недостатком для трансфекции клеток. Размер ДНК, влияет на эффективность трансфекции и поглощение больших молекул ДНК, и может поставить под угрозу создание производительной линии в некоторых типах клеток. Также, возможна ВАС токсичность, поэтому открытая область хроматина должна быть выбрана тщательно. ВАС векторы, полученные из геномных библиотек, могут содержать несколько участков с избыточной экспрессией дополнительных генов, которые при таком уровне эндогенного белка могут снижать жизнеспособность клетки-

хозяина. Таким образом, интеграция ВАС в большом количестве копий может не поддерживаться клеткой - хозяином.

2.9 Векторы для гомологичной рекомбинации

Для создания направленных изменений клеточной линии современная биотехнология использует ресурсы биоинформатики такие как: полную геномную информацию, новые информационные модели/алгоритмы для анализа генома [104, 105]. Появление геномных данных СНО и результаты «омикс» исследований [106] позволяют строить модели для клеток китайского хомячка, такие как математические модели метаболических путей СНО [105, 107]. Эти ресурсы делают доступной работу с базовыми механизмами, соединяющими генотип и фенотип клетки СНО, и делают возможным направленную разработку высокопродуктивных и стабильных линий СНО с планируемым местом интеграции целевой конструкции. Исследователи отмечают, что вероятность прорывов в области технологий развития клеточных линий увеличивается новыми данными редактирования генома СНО [107]. С помощью сравнительного анализа транскриптомов получены важные ранее отсутствующие данные [108-111] полной геномной информации СНО. В недавнем исследовании, данные протеомного анализа клеток СНО, позволили обнаружить 6164 групп белков, что чем в 8 раз больше, известных белков в протеоме СНО. Изменение и оптимизацию кодонов рекомбинантного транскрипта в клетках СНО, отличающегося от транскрипта в клеточных линиях человека, можно сделать эффективнее, благодаря чему улучшить экспрессию гуманизированных белков в клетках СНО [112]. Методы анализа метаболитов в клетках СНО объединенных данных из геномики, транскриптомики, протеомики и метаболомики приводят к идентификации новых генов, которые влияют на скорость роста и производства рекомбинантного белка в клетках [113- 115]. Геномные данные линий СНО способствовали идентификации микроРНК [miRNA] локусов, отвечающих за экспрессию белка [116]. Использование микроРНК [miRNA], для регуляции экспрессии генов также расширяет возможности клеточных линий [116-121]. МикроРНК легко проникает в клетки, и регулирует

множественные цели гена через мРНК интерференцию или репрессируя взаимодействие с 3' нетранслируемой областью [UTR] мРНК [117]. Так как микроРНК не является кодирующей РНК, она не создает дополнительную метаболическую нагрузку для клеток. Биоинформационный анализ генома СНО также может выявить новые геномные активно транскрибируемые точки для сайт-специфической интеграции при создании высокопроизводительных клонов. Это было показано для генома человека [122]. Кроме того, развитие производства терапевтических белков, требует улучшать качество рекомбинантного белкового продукта, который влечет за собой метаболическую инженерию клеток СНО для лучшей модификации белка. Например, повышенная экспрессия гена *N-acetylglucosaminyltransferase-III* в клетках-реципиентах СНО создает профиль гликозилирования белка, который соответствует его максимальной биологической активности, стабильности и безопасности [9]. Проектируются новые инструменты биоинформатики для развития линии клеток, чтобы ускорить появление биофармацевтически новых и улучшения известных препаратов. Инструменты редактирования генома, такие как: нуклеаза цинковых пальцев [ZFNs], эффекторная нуклеаза, подобная активаторам транскрипции [TALENs] и RGENs [РНК-опосредованные инженерные нуклеазы], получаемые из бактерий CRISPR-связанные, позволяют изменять конкретные целевые участки ДНК, точечным образом [136]. Ген-таргетинг, это программируемое повышение продукции благодаря гомологичной рекомбинации. Этот вид рекомбинации практически не происходит в клетках высших эукариот. Чтобы повысить вероятность такого события, исследователи пользуются индукцией репарации искусственного повреждения ДНК в месте, где необходима гомологичная рекомбинация. Редкое событие в обычных условиях, сайт-специфичная перестройка происходит благодаря индукции двунитевыми разрывами ДНК. При индукции повреждений интересующих геномных сайтов, ремонт ДНК, приводит к целенаправленной модификации генома, включая генный нокаут, коррекцию/вставку гена и перестройку хромосом [11, 125-127]. Два сайта рекомбиназы тирозина из фага P1 и дрожжей *Saccharomyces*, Cre и Flp соответственно, которые обычно используются для распознавания и рекомбинации с их помощью соответствующих коротких цис-действующих ДНК - мишеней последовательности: сай-

ты LoxP 34 п.н. и 48 п.н. Flp Целевой Рекомбинации [FRT] [104, 128- 131, 146] (Рисунок 3). Система впервые была использована для производства человеческого моноклонального антитела в клетках CHO [132]. Камеяма и др. [133] создали линию с искусственно амплифицированным геном, используя Cre-опосредованный процесс интеграции во множественные, мутированные loxP последовательности для повторной вставки нескольких генов в один целевой сайт. Аналогичным образом, FLP-В ТМ клеточной линии [Life Technologies, Carlsbad, CA, USA] использовали для Flp интеграции 25 копий кассеты кодирующей антитела, в конкретные, FRT помеченные сайты в геноме, чтобы производить поликлональные антитела RhD человека [132]. Тем не менее, обратимость сайт-специфической рекомбинации является недостатком рекомбиназы Cre и FLP, так как сайты распознавания часто восстанавливаются при интеграции кассеты.

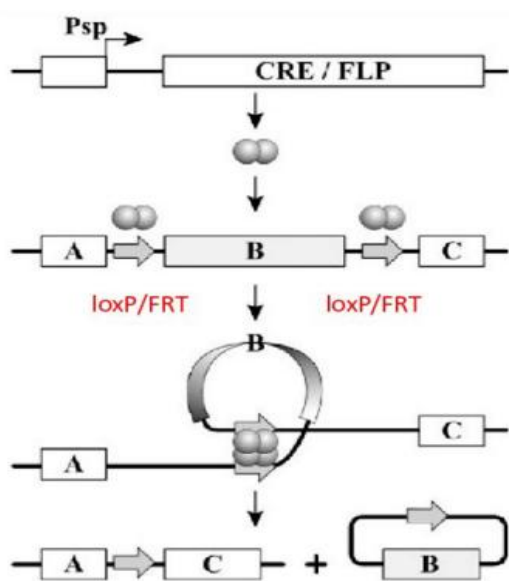


Рисунок 3 - Принцип действия системы/LoxP Cre

Другая технология сайт-специфической рекомбинации использует интегразы таких ферментов, как L и φC31 интегразы, которые нацелены на две последовательности, называемые attP и attB [крепежные участки фага и бактерий соответственно]. После распознавания места запланированной будущей интеграции, в геноме

клетки - хозяина, ферменты катализируют рекомбинацию, которая меняет сайты attB и АТТР при кассетном обмене [139]. Поскольку интегразы не в состоянии распознавать измененные участки, рекомбинация становится необратимой. Используя технологию редактирования генома, осуществимы крупномасштабные генетические манипуляции и анализ ответа клетки на них. Теперь это направление основа для следующего поколения технологий производства рекомбинантного белка в клетке-хозяине, с повышенной продуктивностью и качеством белка. Из используемых нуклеаз для редактирования генома, система Crispr/cas9 наиболее быстро развивается благодаря простому и надежному механизму действия. Эта система основана на комплементарности оснований между небольшим РНК-гидом и целевым геномным сайтом. Она не использует модульные белки для распознавания ДНК. Благодаря этой технологии, созданы простые в использовании, экономичные конструкции с высокой эффективностью целевой интеграции. Это привело к внедрению системы Crispr/cas9 для генетической модификации различных типов организмов и клеток [137-139]. Сравнение преимуществ и недостатков ZFN, TALENS и Crispr/cas методов рассматривалось многими авторами [139-144]. Научные исследования и обзорные статьи об этой системе были опубликованы с 2013, что подчеркивает короткую историю и разнообразие применений этой системы [137-139]. Биотехнологический потенциал Crispr/cas9 в СНО клеточной инженерии представляет особый интерес. В связи с появлением революционных методов изменения генома, как Crispr/cas9 генная инженерия, пересмотрены традиционные стратегии стабильной трансфекции. Сайт специфическая рекомбинация предлагает альтернативную стратегию развития высокопродуктивных и устойчивых клонов, производимых предсказуемым образом [140]. С расшифровкой полной последовательности генома СНО стало осуществимо целенаправленное изменение генома для инженерии клеточной линии. Метод имеет широкий спектр приложений от модификации отдельных генов до геномного скрининга «горячих точек» или регуляции генов. Технологичное и предсказуемое редактирование генома с помощью CRISPR/cas9 предоставляет возможность создавать линии с высоким уровнем производства белков.

2. 10 Системы адаптивного иммунитета бактерий и их применение для рекомбинации у высших эукариот

Система Crispr/cas развивалась в прокариотах для обеспечения адаптивного иммунитета против чужеродных генетических элементов, таких как вирусы и конструкции [141]. Crispr локусы, как правило, состоят из кластерных наборов генов Cas3, 9 и серий повторяющихся последовательностей - прямые повторы, перемежающихся переменными последовательностями - спейсерами. Промежуткам соответствуют короткие последовательности из чужеродных генетических элементов [protospacers], таких как последовательности фагов, на разрезание которых нацелена система [142]. Выделены три основные системы Crispr/cas [1, 3, 9], на основе их генетического содержания и особого механизма CRISPR-опосредованного адаптивного иммунитета [143]. Во II-м типе CRISPR- иммунитета можно разделить на три этапа событий после вторжения чужеродных генетических элементов. Первый этап - приобретение последовательности, которая расщепляется разными Cas белками и, затем, интегрируется в CRISPR массив в качестве сайта узнавания [144]. Биогенез и обработка CRISPR рибонуклеиновой кислоты [crRNA], происходит на втором этапе, когда CRISPR последовательность считана, и образованы небольшие crRNA. Каждая из этих нуклеиновых кислот, состоит из прямого повторения и комплементарной последовательности антигена [145]. Трансактивная tracrRNA транскрибируется с помощью Crispr локуса и гибридизуется с прямым повтором crRNA, формируя РНК комплекс, который расщепляется РНКазой III [146]. На заключительном этапе Cas9 и sgRNA [crRNAs +tracrRNA] связываются, образуя активный рибонуклеопротеидный комплекс. Этот комплекс сканирует ДНК для целевого вторжения crRNA комплементарной последовательностью (спейсером), и направляет расщепление целевой ДНК нуклеазой Cas9[147]. За счет использования рекомбиназы Cas9, была повышена эффективность рекомбинации в клеточных линиях млекопитающих, в отличие от традиционно низкой эффективности гомологичной рекомбинации [147]. Этот тип сайт-специфической рекомбинации, требует сначала создания маркированной линии клеток – хозяев. Затем, для введения представляющего интерес гена и рекомбиназы с

целью гомологичной интеграции в маркированный геномный участок клетки - хозяина. Для создания отмеченной линии клеток - хозяев, репортерную кассету, фланкированную короткими целевыми цис-действующими последовательностями ДНК, распознаваемыми конкретными рекомбиназами, случайным образом интегрируют в различные локусы в геноме, получая стабильно трансфицированную линию. Затем, клеточные клоны подвергают скринингу для определения клетки, в которой высокий уровень экспрессии гена-репортера. Получают выборку клонов, которые имеют ген - репортер, интегрированный в геномные локусы, способствующие высокой скорости транскрипции интересующего гена. Шанс репортера встроиться в такие открытые геномные участки, они также называются геномные горячие точки, при обычной, не сайт-специфической интеграции, является низким. Только 0,1% геномной ДНК содержит транскрипционно активные последовательности [125]. При выведении линии клеток - хозяев, с высокой производительностью целевого белка с помощью рекомбинации, идентифицируют вектор, содержащий интересующий ген и соответствующие ДНК – мишени - комплементарные последовательности. А также отдельный вектор для рекомбиназы, совместно трансфицируют в отмеченные линии клеток. Это приводит к рекомбинации цепи между последовательностями интегрированных репортеров и интересующего гена, тем самым улучшая шансы целевой последовательности гена интегрироваться в геномной горячей точке в отмеченной линии клеток - хозяев [147].

2.12 Дифференциальные амплифицируемые маркеры. Ослабление маркера селекции

Одним из важнейших критериев получения производительной клеточной линии является выбор способа селекции. Строгость маркера селекции может существенно повлиять на вероятность отбора клона с максимальным уровнем экспрессии рекомбинантного гена. Увеличение жесткости отбора - это широко используемый метод, чтобы достичь высокого уровня экспрессии рекомбинантного белка. Более жесткая селекция необходима для отбора меньшего количества клонов для анализа.

Селекции клонов с высокими уровнями продуктивности, полученными при множестве копий целевой конструкции, встроившихся в геном, а также удачных сайтов геномной интеграции. При корреляции экспрессии маркера и целевой последовательности в клетке можно отобрать клоны с наибольшей продуктивностью, повышая концентрацию или действие селективного маркера. Увеличение числа копий генно-инженерной кассеты позволяет увеличить способность клетки компенсировать более жесткое селекционное давление и выжить. Экспрессия интересующего гена будет также зависеть от сайта геномной интеграции. В этом случае, различные дополнительные элементы геномной последовательности, могут помочь преодолеть последствия геномной среды, и привести к лучшей корреляции между интегрированным количеством копий гена и уровнем экспрессии. Жесткость отбора оставляет выживать клетки с наибольшим числом копий кассеты, и может быть увеличена путем увеличения концентрации метотрексата (MTX) в культуральной среде при использовании системы DHFR, или метионинсульфоксимиона (MTS) при использовании GS системы. Очень высокие концентрации большинства антибиотиков обычно используются для генерации стабильной клеточной линии. Дополнительные методы увеличения жесткости отбора требуют снижения прочности селекции самой по себе, за счет использования слабого, минимального промотора или ослабленной последовательности - неоптимизированной по кодонам или с использованием ослабленного сайта инициации транскрипции самого гена, используемого для селекции [42]. В работе описана жесткая система селекции, в которой маркер селекции с ослабленным старт кодоном был помещен перед геном, содержащим оптимальный старт кодон, в бицистронной конфигурации [42]. Положение различных компонентов селекционной системы в векторе относительно друг друга имеет последствия для экспрессии целевой последовательности. Изменение порядка приводит к различной строгости отбора, или к различной экспрессии рекомбинантного белка в отбираемых линиях. Блокировка на 3' границе экспрессионной кассеты увеличивала строгость отбора, по сравнению с такой же структурой на 5' границе, из-за снижения транскрипции пурамицина, гена маркера. Когда такие векторы были стабильно трансфицированы в клетки НЕК293, авторы наблюдали снижение числа устойчивых к пурамицину коло-

ний. Кроме того, сокращение числа устойчивых колоний сопровождалось значительным увеличением интенсивности производства белка стабильно трансфицированным пулом. Также [126] сообщали о дифференциальной экспрессии генов, когда они исследовали влияние двух соседних, интегрированных единиц транскрипции в геномном окружении, а не в векторе, и предположили, что транскрипционные механизмы взаимодействия способствуют регуляции генов в обоих случаях. В настоящее время технологии разработки клеточной линии, используемые большинством биофармацевтических компаний, основаны либо на амплификации метотрексатом [MTX] система, селективным маркером которой является DHFR ген [7], или глутамин синтетазы [GS] система Lonza [165-168]. Обе системы применяются для ингибирования фермента маркера селекции, необходимого для клеточного метаболизма: MTX ингибирует дигидрофолатредуктазу (DHFR) в системе амплификации метотрексата и метионинсульфоксимин (MSX) ингибирует глутаминсинтетазу в системе GS. Для оптимальной работы этих селективных систем препарат/фермент созданы клеточные линии, с нокаутами генов, кодирующих эти ферменты и их эндогенные аналоги. Клеточная линия CHO, дефицитная по DHFR – DG44 была создана в 1980 - х годах [120, 121], а для GS разработана недавно [135, 160]. Схема разработки клеточной линии с использованием технологии амплификации состоит из нескольких стадий: после трансфекции целевой конструкции в реципиентную линию, клетки отбирают и в несколько раундов. Клетки амплифицировавшие ген, отбирают с селективным агентом - метотрексатом или метионинсульфоксимином. Увеличение продуктивности клетки связывают с увеличением числа копий рекомбинантного гена [7], что коррелирует с применением жестких селективных агентов - метотрексата и MSX. Концентрации метотрексата и метилсульфоксимины могут быть ступенчато увеличены. Благодаря последовательному увеличению числа копий трансгена растет продуктивность клеток. При сильном селекционном давлении [7], выжившие клоны будут иметь высокие уровни транскриптов в результате амплификации гена или интеграции вектора экспрессии в открытые, активные участки генома, так как ограничение скорости экспрессии рекомбинантного белка происходит на стадии транскрипции [172]. Строгость отбора может быть усилена за счет увеличения concentra-

ции селективного вещества в культуре клеток. При высоких концентрациях, как правило, замедляется рост клеток, так как селективное вещество – обычно очень ядовито. Альтернативным подходом, является ослабление маркеров селекции. Это позволяет усиливать жесткость отбора при более низких концентрациях селективного агента, так как клетки с низкой экспрессией гена-маркера не имеют селективного преимущества перед клетками исходного генотипа. Непродуктивные клетки не выживают в селективных условиях. Выжившие трансфектанты продуктивны по белку, который является маркером селекции, тем самым приводя к высокой производительности соседнего, целевого гена. Используются две стратегии для ослабления маркера селекции. Первая стратегия включает в себя мутагенез последовательности гена-маркера для снижения его активности. Показаны мутации маркера неомицинофототрансферазы II, снижающие ее сродство к неомицину, это приводит к увеличению производительности отбираемых продуцентов моноклонального антитела от 1,4 до 14,6 раз и 16,8 раз [173]. Вторая стратегия для ослабления маркеров - снижение уровня экспрессии его гена. Для достижения этой цели были использованы различные методы. Деоптимизация кодонов гена маркера селекции путем использования наименее предпочтительных кодонов клетки-хозяина снижает эффективность трансляции гена маркера и, следовательно, приводит к уменьшению экспрессии белка [174]. Или уровень транскрипции гена - маркера может быть ослаблен путем использования промотора слабого вируса простого герпеса - тимидинкиназы [175]. Кроме того, использование области AU-богатых элементов мышшиной орнитиндекарбоксилазы, как соответствующей мРНК, так и белка, которые являются дестабилизирующими элементами для транскрипции, как было показано, успешно ослабляют маркер, что приводит к улучшению продуктивности рекомбинантного белка с помощью МТХ системы амплификации [175]. Также успешная стратегия - создание ослабленного элемента IRES, чтобы уменьшить экспрессию гена селекции и вниз по течению, что приводит к высокому титру рекомбинантного белка [176].

2.13 Инженерия клеточной линии

Количество рекомбинантного белка, производимого в клеточная культура зависит от интегральной жизнеспособной плотности клеток [IVCD] и продуктивности клеточной линии. Для улучшения IVCD, инженерные стратегии сосредотачиваются на продлении долговечности клеточной культуры, увеличивая удельную скорость роста и максимальную жизнеспособную плотность клеток [77]. Также, инженерия клеточной линии используется для улучшения фолдинга, транспортировки и секреции рекомбинантного белка [176]. Разнообразие инженерных стратегий клеточных линий, которые нацелены на различные функции СНО клеток, такие как апоптоз, аутофагия, пролиферация, регуляция клеточного цикла, сборка белка, секреция белка и метаболитов были тщательно подобраны [176 - 178]. Клеточная инженерия может также использоваться для одновременного улучшения IVCD и целевой экспрессии. Например, комбинированные стратегии антиапоптотической инженерии и секреторной инженерии позволили создать линию клеток СНО, в которой повышено производится X-Box - связывающий белок 1 [ХВР-1] и ингибитор каспазы, ингибитор апоптоза X-хромосомы XIAP [178], ХВР-1 является мощным фактором транскрипции, который связывается с элементами эндоплазматического ретикула при ответе на стресс, чтобы стимулировать промоторы генов секреторного пути. Это приводит к увеличению общего синтеза белка, в том числе и целевого синтеза [179]. Тем не менее, было обнаружено, что экспрессия ХВР-1 коррелирует с пониженной жизнеспособностью и нестабильностью сконструированной клеточной линии. Когда вектор экспрессии, содержащий ген XIAP, трансфицировали в клеточную линию, апоптоз ингибировался. При сверхэкспрессии XIAP, для подавления отрицательного влияния ХВР-1 на клетки, жизнеспособность пула увеличилась на 60%.

2.14 Позиционный эффект селекционной кассеты и сайт-направленная рекомбинация

Возможности клеточной инженерии увеличились при использовании белков активирующих гомологичную рекомбинацию. Нуклеазы цинковых пальцев ZFN и эффектора активатора транскрипции, TALEs, эти белки содержат домены, которые могут быть сконструированы таким образом, чтобы распознавать последовательно-

сти специфической ДНК: через изменения комбинаций типов и количества белков цинковых пальцев, модули распознавания ДНК, которые нацелены на уникальные сайты [18-36 п.н.] в геноме. TALENS связывающий домен ДНК представляет собой массив последовательно повторяющихся единиц, каждая из которых ориентирована на определенную ДНК, в высоко консервативном блоке [179, 180]. Химерный белок, где ДНК-связывающий домен слит с доменом эндонуклеазы, нуклеазы цинковых пальцев [ZFN] или активатора транскрипционно-подобной эффекторной нуклеазы [TALEN], может применяться для целевой вставки и\или вырезания специфической последовательности ДНК [181]. Домен эндонуклеазы рестрикции Fok I был использован для этой цели, так как он не имеет специфического сайта, и требует димеризации, чтобы расщеплять ДНК. ZFN или TALEN, ориентированные на соседние ДНК-последовательности к сайту расщепления эндонуклеазы рестрикции, можно расположить рядом с двумя доменами эндонуклеазы Fok I, чтобы позволить благодаря их димеризации расщепление целевой последовательности ДНК. В результате двухцепочечного разрыва ДНК в целевых участках гена, который затем репарируется негомологичной областью, часто возникает изменение гена - сбой рамки, делеции. В качестве альтернативы, трансфекция встраиваемой последовательности с гомологичной областью к месту разреза, может привести к интеграции последовательности с неизменным целевым сайтом расщепления потому, что наличие двухцепочечного разрыва значительно увеличивает вероятность рекомбинации в выбранном месте для интеграции через гомологичные части соединяющихся последовательностей. Тройной нокаут генов - дигидрофолатредуктазы [DHFR], глутамин - синтазы [GS] и alpha1,6-fucosyltransferase8 [FUT8] CHO клетки, был получен при использовании ZFN [182]. Отсутствие генов дигидрофолатредуктазы и глутаминсинтазы обеспечивает отбор клонов с высокой копийностью целевого гена. Отсутствие гена FUT8 позволяет клетке производить антитела без фукозы в профиле гликозилирования. Такие антитела обладают повышенной клеточной цитотоксичностью [ADCC], и на их основе создаются более эффективные рекомбинантные препараты. Используя технологию сайт-специфической рекомбинации ZFN, клеточная линия CHO с нокаутом глутаминсинтазы, также была изготовлена Lonza. Новая клеточная линия по-

зволяет отбирать клоны со значительно большим производством целевого продукта, чем содержащая эндогенную глутаминсинтетазу СНО-К1 линия. Отсутствие гена GS в новой линии клеток - хозяев привело к быстрому получению продуцентов с повышенной экспрессией целевого белка [182]. Другой класс инструментов редактирования генов для направленного мутагенеза или интеграции целевой последовательности представляют мегануклеазы. Эти нуклеазы распознают сайты ДНК, содержащие 12 или более пар оснований. Благодаря их высокой специфичности, эти ферменты также используют для создания двойного разрыва нити на целевом сайте ДНК [183]. Мегануклеаза применялась к созданию клеточной линии для направленной интеграции, что повышало эффективность получения стабильных клеточных линий - продуцентов [183]. Новые данные о геноме СНО и развитие -omics инструментов, создают возможности лучших инженерных решений для исходной клеточной линии млекопитающих [184]. Таким образом, технологии получения оптимизированной линии клеток с помощью множественных генетических модификаций активно развиваются, чтобы повысить стабильность и обеспечить высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков.

2.15 Технологии скрининга клонов

Селекция при помощи антибиотика наиболее часто применяется для отбора, в ее основе преимущество роста трансфектантов в присутствии цитотоксического агента и подавление роста или гибель клеток с исходным фенотипом. Широко используемые гены устойчивости, включают: аминогликозидфосфотрансферазу, дигидрофолатредуктазу [DHFR], пурамицин-N-ацетил-трансферазу, бластицидин S деаминазу и глутаминсинтетазу [GS], ген устойчивости к G418 (генетицину), метотрексату, гигромицину, пурамицину, бластицидину, и метионинсульфоксиминову [186–188]. Выделение модифицированных клеток с помощью этих методов требует от нескольких недель, и вводит зачастую нежелательные гены лекарственной устойчивости в клетки. Идентификация трансфицированных клеток с использованием репортерных генов, таких как хлорамфеникол ацетилтрансферазы, щелочной фосфатазы,

бета-галактозидазы, люциферазы светлячка нуждается в отборе клеток по флуоресценции или окрашиванию [185]. Экспрессия несекретируемого зеленого флуоресцентного белка GFP, может быть измерена без разрушения клетки-хозяина. Этот метод применяется в клеточной сортировке при активированной флуоресценции, но он может быть токсичен для клеток.

2.16 Метод предельных разведений

Методы сортировки клеток необходимы в биотехнологии, клеточной биологии, иммунологии и онкологии. Они обогащают или изолируют клетки на основе метаболических, фенотипических или функциональных особенностей различных типов клеток, таких как: различия во флуоресценции, размере, форме (морфологии) – для этого применяют сортер клеток, метаболизме – при отборе с селективным маркером, или других характеристиках. В результате случайной интеграции чужеродных целевых генов и последующих перестроек генома с помощью систем амплификации. Высокопроизводительные клоны, редки в популяции трансфицированных клеток, имеют сниженные темпы роста, поскольку значительная часть ресурсов расходуется на экспрессию рекомбинантного белка [187]. Чтобы выделить высокопродуктивные клоны, обычно требуется скрининг большого числа клеток. Методы физического разделения - центрифугирование в градиенте плотности, элюирование противотоком или фильтрация отдельных клеток из-за различий в плотности и размерах являются методами первой стадии разделения клеток различных типов [184-187] или удаления большого количества клеток из образца, но не влияющих на клетки-мишени [186]. Создав разные градиенты плотности, можно разделить клетки с разными массами и плотностями. Преимущества методов физического разделения состоит в том, что эти методы не содержат биохимических меток, являются относительно быстрыми, поэтому могут использоваться для большого количества клеток. Однако они не специфичны, поэтому конкретные типы клеток не могут быть выделены. В теории, все клетки моноклональной популяции должны быть генетически и фенотипически идентичны, однако многие промышленно важные клеточные

линии, включая яичника китайского хомячка[CHO], линии NS0 миеломы мыши и гибридные клеточные линии, показывают гетерогенность в характеристиках роста культуры. Эта особенность не ограничивается фенотипическими проявлениями. Было показано, что в трансфицированных клетках, экспрессирующих рекомбинантный белок и в родительской клеточной линии, изменчивость присуща всему клеточному пулу, а не возникает в результате метаболической нагрузки экспрессии рекомбинантного белка. Даже при повторных раундах клонирования или при наличии селективного давления не возникает совершенно однородной линии клеток. И, хотя вариативность уменьшается при последующих раундах клонирования, после субклонирования диспропорции в характеристиках культуры таких как: скорость роста, максимальная плотность клеточной суспензии и специфических свойствах (профиле гликозилирования) производимых рекомбинантных белков сохраняются [176-179]. Гетерогенность является барьером для повышения уровня продуктивности клеточной линии. Снижение удельного производства часто происходит с увеличением числа пассажей из-за возникновения непродуцирующих или низкопродуцирующих субпопуляций в высокопродуктивных клеточных линиях. Субпопуляции часто обладают более высокой скоростью роста, чем продуцирующие клетки. В высокопродуцирующих клетках, обмен веществ и ресурсы направлены на производство чужеродного для клетки белка, поэтому они, имеют более низкие темпы роста. Сообщают, что преимущество в росте лишь на 9% - это достаточно для обогащения популяции низкопродуктивными линиями [11]. Традиционно, метод предельных разведений используется для скрининга, из-за надежности, хотя он очень трудоемкий и затратный по времени [183]. Для получения клональной линии метод предельных разведений – своеобразная «лимитирующая стадия», которая занимает около четырех недель на раунд клонирования. НРС метод основан на разведении суспензии клеток низкой плотности в планшетах, менее чем одна клетка на лунку. Если клетка остается жизнеспособной в селективной среде и размножается, тогда супернатанты единичных клонов клеток используют для анализа производительности, такими методами как энзим-связывающий иммуносорбентный анализ [ELISA]; клоны в лунках, содержащих высокий уровень продукта затем отобраются для дальнейшего роста. Второй

раунд клонирования рекомендуют, чтобы обеспечивать выделение моноклональной культуры и предполагается дальнейшее тестирование культуры на продуктивность, стабильность, скорость роста, морфологию и другие параметры. Несмотря на простоту, относительно других традиционных методов селекции, процесс отбора высокопродуктивных клонов предельными разведениями и последующий анализ продукта может занимать более восьми месяцев, и нести значительные расходы. За это время анализируется несколько сотен клонов, и увеличивается шанс упустить высокопроизводительный, благодаря небольшому количеству проверенных клеток. Существенной проблемой, для всех традиционных методов, является то, что за счет преимущества роста клеток с низкой продуктивностью, распределение одиночных клеток может быть неравномерно, и идентичные клетки занимать несколько лунок планшета [9]. Нет никакого способа, строго доказать, что созданная клеточная линия происходит из одной клетки, поэтому нельзя сказать, что линия клеток моноклональна, а только возможность подтвердить вероятность быть моноклональной. Статистический анализ метода НРС показывает, что после повторного раунда клонирования, получение монокультуры по-прежнему не гарантируется [184, 185]. Все традиционные методы клонирования требуют дальнейшего анализа уровней продукта. Секреция белка может не соответствовать производительности клеток, находящихся в конкретной лунке планшета и, таким образом, требуется выращивать субклоны. Длительный последующий анализ означает, что эта группа методов ограничена числом популяций, которые могут быть проанализированы. Чтобы разделить клетки, суспензию с рассчитанным клеточным титром последовательно разводят в планшетах для получения настолько низкого титра клеток, при котором часть лунок, получивших равный объем суспензии полностью лишена клеток. Далее лунки, содержащие клетки, анализируются на продуктивность и жизнеспособность, затем их наращивают, и повторно клонируют из небольшого подмножества клонов исходного клеточного пула. Для того чтобы обеспечить моноклональность, делается несколько раундов последовательных шагов субклонирования. Дополнительные этапы культивирования клеток для отбора, как правило, с помощью иммуноферментного анализа [ELISA] необходимы для определения производительности клонов, а так-

же очистки клеточного пула от непродуктивных линий. Клонирование отдельных клеток или лимитирующее разведение является технически необходимыми в процессе получения любой клеточной линии, так как производительность белка в отдельных клетках с трансфицированным и амплифицированным целевым геном должна быть стандартизована и стабилизирована. Гетерогенность пула обычно приписывается случайной интеграции гена интереса в геном [188]. Поскольку хромосомное окружение оказывает сильное влияние на целевую последовательность, следовательно, на эффективность транскрипции встроенной конструкции, то трудно получить однородный уровень экспрессии белка отдельных трансфицированных клеток [189]. Кроме того, результаты амплификации гена при больших геномных перестройках, приводят к еще большей неоднородности экспрессии белка [182]. В дополнение к гетерогенности, вызванной случайной интеграцией генов и геномной амплификацией, как было показано, популяция клеток CHO может быстро генетически изменяться. Такая подвижность генома объясняется случайными мутациями и генетическим дрейфом [190]. Кроме того, экспрессия белка в чистой клональной клеточной линии обычно гетерогенна со стандартным отклонением от 50% до 70% от среднего [191]. Другое исследование показало, что хромосомные аберрации встречаются более чем в половине проанализированных клеточных линий, при создании рекомбинантного штамма на основе CHO DG44 [192]. В результате динамической природы клеточного генома CHO, клональные производные, часто проявляют гетерогенность в таких важных для производства характеристиках линии, как удельная скорость пролиферации клеток и гликозилирование рекомбинантного белка [192]. Показатели продуктивности клеточных линий млекопитающих в настоящее время около 5 г/л [4]. Растущий спрос на полноразмерные высокогликозилированные рекомбинантные белки, производимые в клеточных линиях млекопитающих, поддерживает работу оптимизации производительности, которая варьируется от 15 до 120 PCD пикограмм/клетку/в день. Создание новых технологий скрининга клонов может сократить количество раундов метода предельных разведений и, следовательно, качественно сократить время и капиталоемкость при получении производственной линии, отбора редких клонов высокопродуктивных клеток.

2.17 Стратегии маркировки флуоресценцией для различных технологий скрининга высокопроизводительных клонов

Сортировка клеток на основе флуоресценции - это группа методов, позволяющих изолировать клетки по характеристикам, которые можно маркировать конъюгированными флуорофорами и/или флуоресцирующими белками. Методы клоновой селекции используются в сочетании с флуоресцентным мечением и возможностью подключать проточные автоматические сортеры. Выбор техники маркировки клеток для клонирования зависит от свойств конкретной клеточной линии [182]. Экспрессия белка в большинстве получивших конструкцию клеток трансфицированного клеточного пула обычно соответствует средним значениям, и в отдельных клетках показывает незначительные колебания. При этом картина меняется после интеграций копий целевой конструкции в геном и элиминации не встроившихся копий трансгенной ДНК. Только незначительное количество (меньше 1%) исходно трансфицированных клеток показывают уровень производства белка выше, чем средняя производительность клеток в первый день после трансфекции. Из этого следует, что должно быть оценено до десятка тысяч клонов, чтобы найти клеточную линию с благоприятными характеристиками. Такая сортировка выполняется на флуоресцентно-активируемом сортировщике (FACS), специализированном типе цитометра, изолирующем клетки по каплям. Он обеспечивает быструю, объективную и количественную регистрацию флуоресцентных сигналов от отдельных клеток, а также физическое разделение клеток, представляющих интерес [183]. FACS сортирует клетки разных типов в несколько контейнеров, по одной клетке, на основании рассеяния света и картины флуоресценции. Метод требует больших капиталовложений, является относительно быстрым, если требуется разделить большое количество клеток с высокой чистотой, но образование аэрозоля при сортировке капель может представлять риск заражения [188]. Сортировщики микро-капель исключают риск аэрозольного переноса, но они медленнее, чем FACS, и позволяют сортировать только одну популяцию клеток [189]. Проточная цитометрия и сортировка клеток по флуоресценции, появление но-

вых методов отбора, которые используют проточную цитометрию, значительно увеличили количество клонов, которые могут быть экранированы. Несколько миллионов клеток анализируются в течение короткого времени. Субпопуляции и единичные клетки могут быть изолированы из смешанных гетерогенных популяций, если присутствуют в смеси в титре большем, чем одна на миллион [199]. Другие автоматизированные системы для выделения клеток позволяют анализировать и обрабатывать лазером, изолировать интересующие клетки из гетерогенных популяций, используя отрицательный отбор. Нежелательные клетки устраняются лазером, позволяя оставшимся - пролиферировать. Система может применяться для суспензии клеток. Чтобы выбрать максимально продуктивные, клетки культивируют на иммобилизованной матрице, собирая производимый клеткой рекомбинантный белок. Затем его окрашивают флуоресцентно мечеными специфическими антителами. Анализ изображения осуществляется с целью количественного определения секретируемых белков вокруг каждой клетки. Как только клетки выявлены, импульсный лазер используется для устранения нежелательных клеток в непосредственной близости от целевой, оставляя выбранную клетку пролиферировать. Отчеты показывают, увеличение от пяти - до 20 раз производительности клеток, значительное снижение неоднородности отобранного пула и более высокие уровни секретируемых белков.

Проточная цитометрия становится все более необходимой для анализа и сортировки популяций при работе с культурами клеток млекопитающих [200]. Использование антител и конъюгированных с лигандами флуорохромов, с помощью которых можно метить клетки, метки экспрессии белка на клеточной поверхности, флуоресцентные белки-репортеры для методик изоляции стало основой для разработки компьютеризированных систем мониторинга клеточных пулов при разработке биопрепаратов. Экспрессия поверхностных белков у определенных линий гибридомы, соответствует интенсивности сигнала окрашенных поверхностных рекомбинантных белков или антител [187]. Популяции клеток разделяют на группы в зависимости от интенсивности окрашивания поверхности антителом. Уровень поверхностного окрашивания соответствует удельной производительности клетки. Отсортированные СНО клетки с высоким уровнем поверхностной флуоресценции дают 20-25-кратное

увеличение производства рекомбинантного продукта при отсутствии селективного агента метотрексата МТХ. Показано, что в сочетании с МТХ амплификацией, этот эффект увеличивается до 120-кратного [187]. Однако, эта характеристика ограничивается конкретными клеточными линиями. Не все гибридомы могут показывать такую же зависимость [194] и даже разные субклоны происходящие от одной и той же линии демонстрируют изменение поверхностного окрашивания. Метод отбора на основе поверхностной экспрессии белка описывается Демария и соавторами [195] для клеток СНО. Рекомбинантный белок коррелировал с не флуоресцентными молекулами репортера, в этом случае CD20, на клеточной поверхности. Транскрипцию репортерных белков связали через сайт внутренней посадки рибосомы [IRES]. Транскрибируясь с той же мРНК, репортер показывал зависимое соотношение уровней экспрессии с целевым белком, но транслировался отдельно. Клетки, прошедшие через проточный цитометр для анализа высокого уровня экспрессии CD20 на флуоресцентных анти-CD20 антителах, и клетки с высоким уровнем экспрессии целевого белка сортировали, и затем клонировали. Этот метод, как было показано, может выявить продуктивные клональные линии на ранней стадии с большей вероятностью, чем ИФА-анализ, потому что на него не влияют различия в темпах роста и объемах среды в анализируемых лунках. Он также позволяет проводить контроль нестабильности в производстве белка с течением времени. Нестабильность наглядно показывается методом проточной цитометрии как любая неоднородность в интенсивности флуоресцирования популяции, что указывает на не моноклональную культуру [194]. В отсутствие соответствия между экспрессией белков на поверхности и производительностью, клетки могут быть выделены на основании уровня молекулы репортера - внутриклеточного белка, такого как зеленый флуоресцентный белок [GFP]. Ген GFP и его аналоги, часто используемые репортеры экспрессии генов и отбора клеток на основе интенсивности окрашивания [196]. В клеточных линиях млекопитающих, GFP белок применяется для отбора высокопродуктивных клонов по соэкспрессии с рекомбинантным белком и отбора, основанного на интенсивности флуоресценции [197]. Отбор, использующий зависимость между интенсивностью свечения GFP и соэкспрессирующимся рекомбинантным белком, проведен на нескольких клеточных

линиях для производства различных белков, приводя к увеличению экспрессии. Эта зависимость использовалась для клеток эмбриональных человеческих почек HEK293, соэкспрессирующих рекомбинантный рецептор серотонина крысы и белок GFP. Культуры были подвергнуты неоднократным раундам сортировки; самый высокий уровень интенсивности флуоресценции привел к значительному увеличению продукции рекомбинантного белка. При производстве моноклональных антител часто используют последовательность целевого гена и репортера, соединенных через IRES элемент. Маркирующий белок совместно считывается с тяжелой или легкой цепью антитела. Фрагменты генов тяжелых и легких цепей антитела нередко включаются в различные хромосомы, и потеря любой части означает, что клетки не смогут производить функциональные антитела. Только клетки производящие всю молекулу целевого белка можно отобрать при сортировке методом двойной флуоресценции. 1% клеток гетерогенного пула имеет двойное окрашивание. Скрининг среди этих клеток позволил авторам отобрать линии с 44-кратно увеличенной продуктивностью.

2.18 Флуоресцентные Активированные сортировки клеток

FACS является сортировочным оборудованием, которое может одновременно контролировать уровни флуоресценции клеток на нескольких длинах волн со скоростью 10^8 событий в час [207]. Сортировщик клеток был изобретен Максом Фулвайлером в 1965 году [190] и усовершенствован для применения отбора по флуоресценции [191, 192]. Суспензию для анализа вводят в сортировщик FACS, где она распределяется до единичных клеток, движущихся в потоке. Каждая из них окрашивается одним или несколькими лазерными лучами. Исходящую от клетки флуоресценцию измеряют с помощью соответствующего оптического детектора и анализируют. Машина затем использует заряд капли, содержащей клетку, чтобы сортировать ее в емкость для отбора с заданными параметрами. В зависимости от сигнала флуоресценции, могут быть также измерены параметры клеточной суспензии, такие как зернистость и размер клеток [208]. Точность скрининга высокопроизводительных клонов на основе FACS зависит от сигнала флуоресценции, который остается свя-

занным с клеткой. Таким образом, он больше подходит для отбора высокопродуктивных клеточных клонов, которые не секретируют, а накапливают рекомбинантный белок [208]. Было предложено несколько стратегий для отбора клонов высокопроизводительных клеток, для секретируемого белка по анализу флуоресценции. Первая стратегия известна как анализ микрокапель геля, он инкапсулирует клетку в биотинилированной агарозной матрице с диаметром 35 мкм [209]. Флуоресцентно меченные первичные антитела добавляют к микрокапле для связывания с секретируемым целевым белком. Затем, вторичные биотинилированные антитела, которые используются для захвата первичного антитела и комплекс, связываются со стрептавидином, иммобилизованным на биотинилированной агарозной матрице. Таким образом, клетка и ее секретируемый белок остаются в микрокапле для последующей обработки с помощью FACS. Вторая стратегия включает связывание целевого белка около клеточной поверхности аффинной матрицей на желатиновой основе с низкой проницаемостью среды для захвата секретируемого рекомбинантного белка [210-211]. Иммобилизованные белки могут быть обнаружены с помощью флуоресцентных антител, помечены и обработаны на цитометре. Эти две стратегии улучшили способность метода FACS в идентификации и выделении клонов, тем не менее, протоколы для иммобилизации секретируемых рекомбинантных белков являются технически сложными, и требуют много времени [210]. Было высказано предположение, что количество секретируемого рекомбинантного белка, который временно связывается с клеточной поверхностью должно соответствовать общему количеству белка, секретируемого из клетки. Этот метод назван - «метод холодного захвата». Он использует флуоресцентно меченые антитела, связывающиеся с поверхностно ассоциированным рекомбинантным белком при низких температурах 0-4 °С. Затем клеточные клоны подвергаются трем раундам повторяющихся сортировок с помощью FACS, чтобы отобрать лучшие. С помощью этого метода были выделены клоны с 20 - кратным увеличением удельной производительности по сравнению с пулом несортированных клеток [210].

2.19 ClonePix. Автоматизированный комплектовщик колоний

Существует целый ряд автоматизированных систем комплектации колоний таких, как системы ClonePix от Genetix [<http://www.genetix.com>], и CellCelector™ от Авизо [<http://www.aviso-gmbh.de>]. Первоначально использовавшиеся для отбора бактериальных или грибковых колоний, эти системы совсем недавно были применены к клеткам млекопитающих. Клетки иммобилизуют в полужидкой среде – это дает возможность выращивать их в форме колоний. Секретированный белок сохраняется в непосредственной близости от продуцирующих колоний благодаря средней вязкости геля, в котором он может быть визуализирован путем добавления флуоресцентно меченых связанных антител. Флуоресценцию и иммуноосаждение, рассматривают как "гало" вокруг колонии и нормализуют по размеру колонии (Рисунок 4). Секретируемые белки захватываются антителом, конъюгированным с изоцианатом флуоресцеина [FITC], которое ранее добавили к клеткам в полутвердой среде. После захвата произведенного клеткой рекомбинантного белка с помощью антител, они сохраняются иммуноосаждением вокруг клона и, следовательно, образуют флуоресцирующую структуру. При измерении секреции флуоресценция, данные от видимого света и флуоресцентных изображений объединяются, и система по отсутствию свечения может исключить колонии, которые не производят целевой белок, или производят его в недостаточном количестве, предотвращая контаминацию лучших популяций непроизводительными клетками [206].

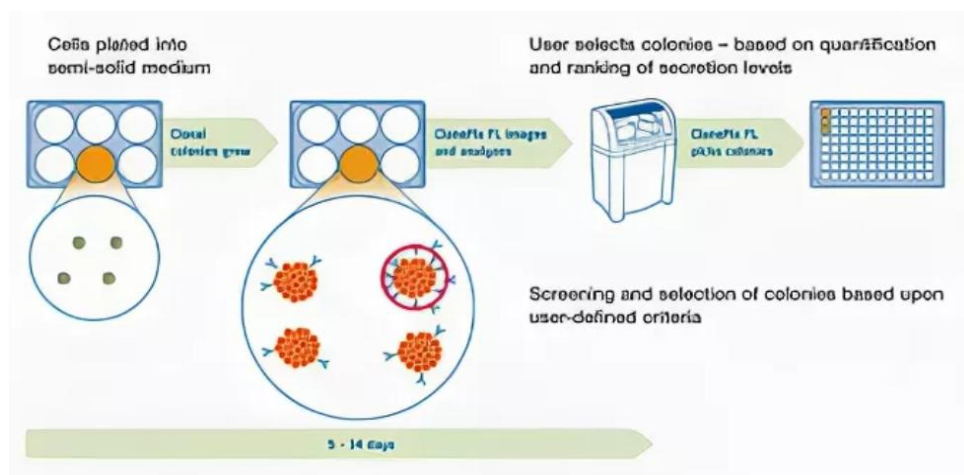


Рисунок 4 - Схема отбора системы ClonePix

Оригинал схемы представлен на сайте:

<https://www.genengnews.com/magazine/122/using-clonepix-fl-to-assess-monoclonality/2/>

Как следствие, клоны классифицируются по интенсивности флуоресценции. Производительные клеточные клоны затем отбирают с помощью микроштифтов и переносят в новый планшет для дальнейшей характеристики. Весь процесс визуализации и отбора 10000 производительных клеточных клонов завершается в течение одного часа, и этот метод достаточно чувствителен, чтобы выделить редкие хорошо экспрессирующие клоны, которые составляют около 0,003% трансфицированного пула [211]. Из-за высокой пропускной способности этого метода, система ClonePix FL была использована в различных исследованиях для последовательного отбора высокопроизводительных клонов, секретирующих ряд рекомбинантных гуманизированных антител. Преимуществом платформы является то, что она построена для работы с высокой пропускной способностью, весь процесс отбора полностью автоматизирован и осуществляется с помощью робототехники. Cell Xpress™ технология сочетает в себе выявление продуктивности живых клеток и уничтожение лазером контаминирующих клеток для хорошей очистки высокопроизводительного клона в образце. Цветная визуализация продукции живой клетки в технологии Cell Xpress™ достигается за счет одновременного использования реагентов обнаружения флуоресценции, которые связываются либо с производительными клетками или экспрессируемым рекомбинантным белком. Кроме того, исследуемая лунка планшета покрыта матрицей, способной захватить секретируемый целевой белок, так как большинство рекомбинантных белков секретируется клеткой. При производстве терапевтических антител, белок G используется для захвата белкового продукта. Каждая клетка в лунке анализируется по количеству секретируемого рекомбинантного белка с помощью измерения интенсивности флуоресценции соответствующих детектирующих реагентов. Дополнительные критерии, такие как: темпы роста клеток, размер клеток и, следовательно, конфлюентность в лунке, также будут влиять на анализ первичных клонов. Производительные клетки в лунке идентифицируются как целевые. Дальше проводится очистка пула от контаминации не произво-

дательными клетками с помощью лазера. Лазерный луч направляется на низкопроизводительные клоны в той же лунке, чтобы вызвать фотомеханический лизис. Высокопродуктивные клетки остаются в лунке и получают преимущество в скорости роста в разрастающейся биомассе. Так как процесс очистки происходит в замкнутой системе, вероятность заражения очень низкая. Клетки, полученные из различных образцов от 10 до 10^8 клеток, могут быть очищены до 99,5% чистоты популяции. Процесс требует менее 30 секунд для скрининга одиночной лунки планшета, поэтому большое количество клеточных клонов может быть подвергнуто скринингу в течение короткого времени, чтобы идентифицировать высокопроизводительные клетки. Кроме того, показано, что результат Cell Xpress™ технологии состоит в хорошем соответствии с пиком производительности IgG в суспензионных культурах, выращиваемых в колбах при экспериментальной экспрессии без оптимизации. Cell Xpress™ технология обычно отбирает клеточные линии с уровнем секреции антитела около 50 пг/клетку в день [211]. Также показано, что лазер используемый в технологии может привести к повреждению высокопроизводительного клона.

2.20 Система виолончель

Система «виолончель» для автоматизации сортировки [ТАП] [<http://www.automationpartnership.com>] - это автоматизированная система для производительного отбора высокопродуктивных клонов. Процесс генерации и отбора клеточной линии, как адгезионных, так и суспензионных клеток, осуществляется в закрытой системе, при отрицательном давлении в ламинарном шкафу, который инкубирует клетки и измеряет клеточный рост. Цельные пулы трансфицированных клеток подаются в прибор, и затем автоматически попадают в сортировку. Клональность проверяется интегрированным микроскопом, автоматизированные процессы программировано контролируются благодаря повышенной емкости робототехники. Это включает в себя перенос клетки на свежие лунки или чашки – с ферментативной средой для адгезионных клеток в случае необходимости; сбор проб клеток или образцов супернатанта для анализов или сбор образцов клеток для криоконсервирования; по-

лучение субклонов из линий с необходимыми характеристиками. Система может обрабатывать 600-800 планшетов, представляющих до 12-ти селекционных экспериментов и, таким образом, тысячи клеточных линий анализируются параллельно, что делает это самой быстрой системой отбора, из доступных. Однако, это устройство чрезвычайно дорого, из-за чего ее применяют только очень крупные компании. Системе также усложняет огромное количество отобранных линий для получения небольшого количества субклонов с благоприятными характеристиками, в отличие от других автоматизированных методов, где только небольшое количество высокопроизводительных линий требуют скрининга.

2.21 Метод отбора люминесцентным метотрексатом

В качестве альтернативы, существует стратегия, при которой измеряют уровень внутриклеточных маркеров селекции. В одном исследовании, метотрексат меченный флуоресцеин изотиоцианатом [MTX-F] был использован для связывания с внутриклеточным маркером селекции - дигидрофолатредуктазой [DHFR]. Было показано, что распределение производительности клеточных клонов является самым выгодным для последующей выборки при среднем уровне MTX-F, и такой пул обладает наиболее интенсивной флуоресценцией [208]. В зависимости от интенсивности сигнала флуоресценции в гетерогенном пуле клеток, FACS изолирует клетки с самыми высокими уровнями рекомбинантного белка. Флуоресцентно меченый метотрексат, может проникать через мембрану клетки, для количественной связи продуктивности с дигидрофолатредуктазой [DHFR], что позволяет сортировать продуктивные клоны. Клетка с высоким количеством копий целевого белка может быть выбрана по высокой интенсивности флуоресценции и затем, проведен анализ производительности клеточной линии – ее потомства. Отобранный высоко-производящий клеточный пул основан на устойчивости к MTX, которая пропорциональна количеству копий DHFR. Как правило, отбор высокопродуктивных клонов в этой системе предполагает поэтапное увеличение уровня MTX в течение долгого времени. В результате пул обогащается клетками с большим количеством копий и, следовательно, такие высоко-

производительные популяции часто неоднородны по производительности рекомбинантного белка. Отбор высокопродуктивных моноклональных линий затем проводят традиционными методами, такими как НРС, и последующим анализом продукта. Этот метод приводит в изоляции высокопроизводительных клеток с амплифицированным целевым геном в несколько недель, а не месяцев.

2.22 Выбор высокопроизводительных клонов на основе скорости клеточной секреции

Описанные методы применимы для всех типов суспензионных клеточных культур. Секретируемые белки быстро растворяются в среде, а проточная цитометрия не может быть использована для сортировки клеток по белковым продуктам, которые отделены от них. Для использования цитометра при отборе, необходим механизм, сохраняющий рекомбинантный белок в непосредственной близости от клеток, которые его выделяют. Для этого были разработаны такие методы, как анализ матрицы секрета и технология гелевых искусственных микрокапель. Технология искусственных микрокапель геля обеспечивает измерение белка, секретируемого клеткой. Впервые метод описан для использования у бактерий [196], эта система используется для бактериальных, дрожжевых штаммов и клеточных линий млекопитающих [197,196]. В клетках млекопитающих эта технология используется чтобы обнаружить и отделить субпопуляции, производящие целевой белок, и применяется для селекции [198]. В данном методе, клетки капсулируются в биотинилированные капли агарозы. Биотинилированная расплавленная агароза содержащая суспензию клеток в низкой плотности, эмульгируется в форме небольших капель. Внеклеточный домен авидина связывается с биотинилированным антителом к целевому протеину, секретируемому клеткой. Антитела специфически захватываются в геле и связываются с биотинилированной матрицей через линкер авидина. Одиночные клетки, помещенные в бисер, секретируют белок, попадающий на связующие сайты. Такой белок связывается с флуоресцентно конъюгированным антителом или специфическим антигеном, удерживая их вблизи производительной клетки. Имобилизованный на эту матрицу белок соз-

дает с конъюгированным антителом прочную связь. Благодаря чему концентрация флуорофора около клетки зависит от экспрессии гена интереса, и служит для селекции. Микрокапли с высокой интенсивностью флуоресценции могут отбираться методом проточной цитометрии и сортировки. Редкие высокопродуктивные клетки из гетерогенной популяции, изолируются из пула с частотой от 0,1% от трансфицированных клеток, что дает пятикратное увеличение удельной производительности обогащенного с помощью проточного цитометра пула [199]. Преимуществами данной системы являются более строгое ограничение диффузии продукта и высокий уровень дифференцировки уровней производительности клонов – на порядок выше, чем матричных анализах [199]. Как в методе анализа секрета матрицы, этот способ может быть использован для измерения любого продукта, который можно отметить флуорохром-конъюгированными антителами. Незначительный недостаток этой системы, как отмечают, расход геля с растворенными антителами. Вследствие низкой плотности посева клеток много бисера-субстрата остается пустым, чтобы обеспечить единичное размещение клеток из бисера, как правило, только 10-15% из бисера содержат клетки [201].

2.23 Технологии скрининга на основе технологии «дисплей». Магнитно-активированная сортировка клеток

Вторая широкоиспользуемая группа методов разделения сложных гетерогенных клеточных популяций - сортировка клеток, активируемая магнитным полем (MACS) [212]. Основные различия в протоколах маркировки и сортировки клеток, которые необходимо учитывать при выделении трансфицированных клеток, сводятся к наличию и отсутствию поверхностных белков, благодаря которым происходит сортировка. После сортировки MACS, клетки должны быть подсчитаны, и вручную помещены в чашки для культивирования, процедура, которая может занять некоторое время. При магнитной сортировке клетки могут быть разделены только на основании различий в составе их поверхностных антигенов. Выделение клеток на основе маг-

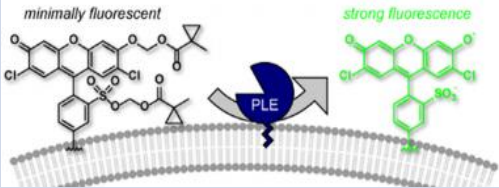
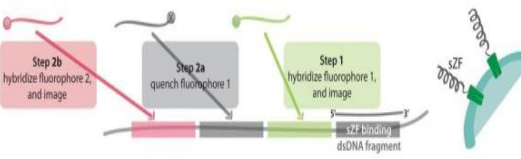
нитных антител - этот метод основан на мечении антителами, связанными с крошечными железными шариками. Затем, клеточная суспензия разделяется в магнитной колонке, удерживая клетки, несущие шарики, в магнитном поле [145, 146]. Этим методом может быть быстро выделено большое количество клеток. Положительный отбор путем маркировки клеток-мишеней является самым быстрым и наиболее эффективным способом выделения подмножества клеток с высокой чистотой и выходом. Отрицательный отбор необходим, когда интересующие клетки должны быть «нетронутыми» для последующих анализов, как например клетки иммунной системы, легко изменяющие профиль экспрессии, или если маркер недоступен для клеточной поверхности [147]. Следовательно, все интересующие клетки, которые необходимо извлечь из образца, и только они, должны быть помечены магнитными шариками. Поскольку разделение основано на одном параметре (на намагниченности), этот метод эффективен для выделения одной популяции клеток. Различные популяции клеток могут быть выделены из одного образца путем последовательной магнитной сортировки. В ряде исследований использовались многопараметрические, многоцелевые методы магнитной сепарации, объединяющие преимущества методов скрининга и отбора. Чалмерс с соавторами [213] добились разделения клеток на основе степени их магнитного мечения с использованием магнитных диполей для генерации высоких градиентов магнитного поля. Этот подход достиг высокого уровня чистоты, но страдал относительно низкой пропускной способностью. Адамс [214] представил технологию микрофлюидики MT-MACS для одновременной сортировки множества целевых типов клеток в непрерывном потоке. Комбинацией двух разных магнитных меток с разной намагниченностью и размером можно последовательно изолировать два типа клеток. Устройство хорошо подходит как для сортировки мишеней, которые меньше или сопоставимы по размеру с бактериями, так и для клеток млекопитающих, несмотря на их размеры. Магнитно-активированная сортировка клеток [MACS] это простое решение, когда требуется не моноклональная культура, а обогащение клеточного пула клонами, представляющими интерес. MACS зависит от экспрессии специфических маркеров поверхности, которые могут быть распознаны с помощью магнитного шарика, меченного антителами. Было описано восемь генов

синтеза стрептавидина в качестве селективных маркеров, которые могут быть объединены с парамагнитными гранулами для выбора трансфицированных клеток. Используя MACS, можно выделить редкие клеточные популяции и отделить большое количество клеток, больше чем 10^{11} , за часы [184]. Процедура магнитного отбора является простой и быстрой. Этот метод дает очень чистую популяцию трансфицированных клеток и может быть использован для широкого спектра биологических применений. Несколько новых подходов было разработано на этой основе, как простые и быстрые стратегии отбора. Был предложен новый вид селекции под названием система амплификации антиген-опосредованных генетически модифицированных клеток [AMEGA], в которой используется химерное антитело/рецептор, вызывающий сигнал роста в ответ на родственный антиген, без селекции антибиотиком [205-206]. Система отбора состоит из двух векторов; один содержит ген - мишень и биотин-лигазу в качестве репортера, а другой второй ген - мишень и субстрат пептид, связанный с укороченной формой человеческого рецептора фактора роста нервов [Δ LNGFR]. Взаимодействие стрептавидина с биотином является очень сильной нековалентной связью биололекул, на несколько порядков сильнее, чем взаимодействие антигена с антителом. Ген - мишень кассеты в каждом векторе используется для экспрессии генов, представляющих интерес. Lentivекторы, несущие целевую конструкцию, при временной трансфекции, и экспрессируют одну или несколько белков - мишеней. Бира удерживается в эндоплазматическом ретикулуме [ER] после экспрессии, он эффективно связывает теги Бира, слитые с рецепторами Δ LNGFR, когда они проходят через эндоплазматический ретикулум. Биотинилированный рецептор Δ LNGFR транспортируется на поверхность клетки, где маркирует клетки - мишени. Биотинилированные клетки имеют высокое сродство к стрептавидину, и могут быть быстро и эффективно захвачены мечеными стрептавидином шариками [214]. Используя этот метод, можно получить чистые популяции трансфицированных клеток. Система была испытана на различных типах клеток, в том числе 293T, HCT-15, SupT1 и K42-91a, клеточной линии фибробластов мыши.

2.25 Метод p-hook и его модификации

В 1996 году для отбора транзитивно трансфицированного пула, была предложена техника селекции, основанная на адгезии клеток на носителе. Авторы представили ее как технологию быстрого отбора трансфицированных клеток из общей популяции в культуре. Система использует рекомбинантное антитело для того чтобы произвести "молекулярный крюк" одноцепочечное антитело (sFv) на поверхности транзитивно трансфицированных клеток. Магнитно активированная сортировка – это развитие метода p-hook. Разные модификации этого метода сейчас используются для научных и медицинских целей. (Таблица 2)

Таблица 2 - Применение различных модификаций системы p-hook

Применение метода	Схема действия	Ссылка
Изучение экспрессии генов		<p>Fluorogenic Targeting of Voltage-Sensitive Dyes to Neurons.</p> <p>Liu P, Grenier V, Hong W, Muller VR, Miller EW. <i>J Am Chem Soc.</i> 2017 Dec 6;139(48):17334-17340. doi: 10.1021/jacs.7b07047. Epub 2017 Nov 20.</p>
Отделение трансфицированных клеток от не-трансфицированных		<p>Philippe Roux,^{1,2} Caroline Alfieri,^{1,2} Mohammed Hrimch,² Eric A. Cohen,² and Jerome E. Tanner^{3,*} Activation of Transcription Factors NF-κB and NF-IL-6 by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protein R (Vpr) Induces Interleukin-8 Expression. <i>J Virol.</i> 2000 May; 74(10): 4658–4665.</p>
Маркировка клеток		<p>Barcoding cells using cell-surface programmable DNA-binding domains.</p> <p>Mali P, Aach J, Lee JH, Levner D, Nip L, Church GM. <i>Nat Methods.</i> 2013 May;10(5):403-6. doi: 10.1038/nmeth.2407. Epub 2013 Mar 17</p>

Линии клеток млекопитающих из нескольких источников были трансфицированы вектором (pHook-1), который кодировал sFv, слитый с трансмембранным якорем, и была показана экспрессия целевой конструкции в клетках, несущих химерный белок для селекции на их мембранах. Трансфицированные клетки отбирали из общей популяции в культуре в силу их способности связываться с магнитными шариками, покрытыми гаптенем. Было показано обогащение пула клетками, принявшими селекционную кассету с использованием усиленной адгезии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение генетической конструкции, содержащей гены легкой и тяжелой цепей инфликсимаб под контролем разных гибридных промоторов. Гены, кодирующие легкую и тяжелую цепи МАТ инфликсимаб, были клонированы в экспрессионный вектор pViro-neo [InvivoGen, США] для получения экспрессионного вектора pVitroneo-Infliximab-LC-НС. При этом ген тяжелой цепи был соединен через IRES-элемент с геном, кодирующим маркер устойчивости к антибиотику G418. Таким образом, эти два гена транскрибировались в одну мРНК, с которой транслировались два белка, благодаря чему достигался более жесткий контроль экспрессии тяжелой цепи. Ген тяжелой цепи находился под контролем промотора CMVenh/rEF1, ген легкой цепи – под контролем промотора SV40/mEF1.

Элюция фрагментов из агарозного геля.

DNA – фрагменты имеющие необходимую, относительно контроля ДНК-маркер O'GeneRuler 100-10,000 bp (Fermentas, SM1173), длину вырезали из геля, переносили в предварительно взвешенные 1,5 мл пробирки и, повторно взвешивали для вычисления объема элюируемого фрагмента (плотность геля принимали равной единице). Добавляли 3 объема буфера QG. Инкубировали 10 минут при 50⁰С (для лучшей очистки можно 2-3 раза интенсивно перемешивать в течение инкубации.) Добавляли 1V изопропанола, смешивали и переносили на колонки, центрифугировали 1 минуту. Пробирку для слива очищали, затем колонку промывали еще раз 500 мкл буфера QG. Пробирку для слива очищали, затем в колонку добавляли 750 мкл буфера PE, для лучшего выхода инкубировали пробирку на столе 2-5 минут. Центрифугировали 1 минуту на максимальных оборотах 13000 rpm. Колонки переносили в чистые микроцентрифужные пробирки и добавляли 30 мкл буфера для элюции. Инкубировали 2 минуты на столе и центрифугировали 1 минуту на максимальных оборотах (13000 rpm). Очищенную днк отправляли на секвенирование.

Конструирование гена EYFP-IRES-iggHATiBP-mucPDGFR

Указанный ген конструировали в векторе pUC57 на основе вектора pCI-neo [Promega, США]. На первом этапе была синтезирована [«Синтол», Россия] конструкция iggTiBP+mucPDGFR во временном транспортном векторе pUC57. Векторы pUC57-iggHA+mucPDGFR [реципиент] и pEYFP [Clontech, США] [донор] обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BglII/BsrGI [использовали эндонуклеазы и ферменты нуклеинового обмена производства Fermentas [Литва]]. После выделения продуктов рестрикции в 1%-ном агарозном геле [камера для горизонтального электрофореза SE-2, Helicon, Россия] участок размером 800 п.н., содержащий ген EYFP, лигировали с соответствующими компонентами для получения конструкции pUC57-EYFP-iggHA+mucPDGFR. Из этой конструкции по сайтам для Xba/Not вырезали фрагмент EYFP-iggHATiBP-mucPDGFR и переносили его в вектор pCI-neo. ПЦР-продукт гена IRES [IRES FMDV из вектора pVITROneo [InvivoGen, США]] вырезали по сайтам Nhe/EcoRV и получали путем лигирования готовую конструкцию гена EYFP-IRES-iggHATiBP-mucPDGFR.

Конструирование гена EYFP-IRES-iggHATiBP-CBD-mucPDGFR

Ген EYFP-IRES-iggHATiBP-CBD-mucPDGFR получали на основе ранее созданного вектора pCI_EYFP-IRES-iggHATiBP-mucPDGFR. ПЦР-продукт гена CBD [ген синтезирован в фирме «Синтол», Россия] в векторе pUC57 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции SacII и XhoI, разделяли продукты рестрикции в агарозном геле, вырезали участок размером 460 п.н., содержащий ген CBD и лигировали его с целью получения готовой конструкции, гена EYFP-IRES-iggHATiBP-CBDmucPDGFR. Правильность сборки экспрессионного вектора проверяли с помощью расширенного рестрикционного анализа. Нуклеотидные последовательности обоих генов и прилежащих к ним участков были подтверждены секвенированием [Evrogen, Россия].

Выделение m-RNA Micro-FastTrack 2 mRNA Isolation Kit (Thermo Scientific, USA)

Для выделения матричной РНК из клеток млекопитающих отобраны клетки по 2×10^6 на пробу. Клетки осадил центрифугированием, отмыли PBS буфером. Лизирующий буфер готовили, добавляя 20 микролитров. рибонуклеазы добавляли к 1 мл лизи-

рующего буфера. К отмытым клеткам добавляли 1 мл лизирующего буфера и инкубировали 20 мин. при $t=450\text{ C}^0$. Центрифугировали 4000g 5 минут. Переносили супернатант в новые пробирки. Добавляли 63 микролитров 5M раствора NaCl, и перемешивали. Для удаления ДНК раствор 4-6 раз пропускали через шприц с иглой №21. Перенесли супернатант в пробирку с Oligo(dT) cellulose power. Инкубировали при комнатной температуре 2 мин. Затем 20 минут инкубировали при бережном покачивании. Центрифугировали 4000g 5 минут. Бережно отбирали и удаляли супернатант. К осадку добавляли 1,3 мл связывающего буфера (Binding Buffer) Центрифугировали 4000g 5 минут. Убирали супернатант, повторяли процедуру 2 раза. Промывали осадок (Oligo(dT)) 500 микролитров связывающего буфера. Центрифугировали 4000 g 10 секунд. Промывали (Oligo(dT)) 200 микролитров низкосолевым промывочным буфером, центрифугировали 4000 g 10 секунд. Переносили колонки в новые микроцентрифужные пробирки 1,5 мл. Ресуспензировали в 100 микролитров буфера для элюции. Центрифугировали 4000 g 10 секунд. Повторили процедуру 2 раза. К 200 микролитров элюата добавляли 10 микролитров гликогена, 30 микролитров 2M ацетата натрия, +600 микролитров этанола и смешивали. Замораживали в сухом льду и далее в морозильнике -70^0 C . Размораживали центрифугированием при 16000g 15 мин $+40^0\text{ C}$, удаляли весь этанол. Ресуспензировали матричную РНК в 10 микролитрах буфера для элюции (Elution Buffer). Хранили при -70^0 C .

Выделение хромосомной DNA набором GeneJET™ Genomic Purification Kit.

Для выделения хромосомной ДНК из суспензионных клеток млекопитающих собирали количество клеток не менее 5×10^6 на пробу. Клетки осаждали центрифугированием 250g 5 минут, отмывали PBS буфером. К отмытым клеткам добавляли 200 микролитров PBS буфера и ресуспензировали. Добавляли 200 микролитров лизирующего раствора, с протеинкиназой А. Тщательно смешивали до получения однородной суспензии. Инкубировали образец при 56^0C , периодически перемешивая до полного лизиса (около 10 минут). Добавляли 20 микролитров раствора рибонуклеазы А смешали, инкубировали при комнатной температуре 10 минут. Добавляли 400 мл 50% этанола и перемешивали. Переносили лизат на колонки, центрифугировали при 6000g 1 минуту. Переносили колонки в новые пробирки или очистили пробирки от жидкости. Добавили 500 микролитров промывочного буфера (Wash Buffer) центрифугировали при 8000g 1 минуту. Удаляли промывочную жидкость из пробирок.

Добавляли 500 микролитров промывочного буфера (Wash Buffer) центрифугировали при 12000g 3 минуты. Переносили колонки в новые 1,5 мл пробирки. Добавили 200 микролитров буфера для элюции (Elution Buffer), инкубировали 2 мин. при комнатной температуре. И центрифугировали 1 минуту при 8000g. Определяли концентрацию ДНК. (Хранили при -70°C).

Обратная транскрипция.

Из матричной РНК получали с-DNA методом обратной транскрипции.

Состав реакционной смеси для отжига праймеров:

1. m-RNA dEPO $C=9$ пикограмм/мкл – 9 мкл.
2. смесь Oligo(dT)15N – 3,5 мкл.

Общий объём реакционной смеси – 12,5 мкл.

Инкубировали 5 минут при $+65^{\circ}\text{C}$, остужали во льду, центрифугировали, инкубировали 5 минут при 0°C .

Состав реакционной смеси для реакции обратной транскрипции:

1. смесь m-RNA dEPO и Oligo(dT)15N – 12,5 мкл.
2. dNTP mix 10 mM - 2 мкл.
- 3 5x буфер для M-MuLV Reverse Transcriptase – 4 мкл.
- 4 M-MuLV Reverse Transcriptase - 2,5 мкл.

Общий объём реакционной смеси – 20 мкл.

5 Инкубировали 60 минут при $+37^{\circ}\text{C}$. Реакцию заканчивали нагревом до $+70^{\circ}\text{C}$ для инактивации фермента.

ПЦР для хромосомной ДНК

Состав реакционной смеси для проведения ПЦР:

10X буфер для Tag- полимеразы – 10 мкл.

Вода деионизированная – 54 мкл.

2 mM смесь dNTP – 10 мкл.

Forward primer – 2 мкл. $C=10$ пмоль/мкл

Reverse primer – 2 мкл. $C=10$ пмоль/мкл

Матрица хромосомная ДНК – 10 мкл. $C=0,2$ мкг/мкл

Pfu+ Tag- полимеразы (2,5 у/мкл) – 2 мкл. Соотношение Pfu: Tag 1:50

8 MgCl₂ 25mM - 10 мкл.

Общий объём реакционной смеси – 100 мкл. (2 пробы по 50 мкл в 0.2мл пробирки для ПЦР по 50 мкл.)

ПЦР проводили на амплификаторе Mastercycler фирмы Eppendorf в следующих условиях:

95 градусов – 10 минуты

95 градусов - 45 секунд

60 градусов - 45 секунд

72 градуса – 1 м. 40 с. 40 циклов

72 градуса – 10 минут

4 градуса

Полученный ПЦР продукт очищали от полимеразы и неспецифичного ДНК, пропуская через 1% агарозный гель и элюируя фрагмент размером 750 п.н. С помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)

Культивирование клеточной линии CHO-S

Культивирование клеточной линии CHO-S [Invitrogen, США] осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 125 и 250 мл на шейкере-CO₂-инкубаторе Multitron Cell [Infors HT, Швейцария]. Частота вращения 125 об/мин в атмосфере 5% углекислого газа при температуре 37° и влажности 95%. Пересев осуществляли каждые 2-3 дня до плотности $0,3 \times 10^6$ клеток/мл. Использовали бессывороточную питательную среду SFM (Lonza, Швейцария)

Анализ инфицирования клеточных линий микроорганизмами рода *Mycoplasma*

Отбрали по 100 мкл культуральной жидкостью в 1,5 ml. Пробирки с КЖ инкубировали при 95°С в течение 5мин. Готовили смесь для ПЦР - необходимое количество регидрирующего буфера из набора Sigma (cat. № M4695) из расчета 23 мкл на одну пробу. К регидрирующему буферу добавили Taq-полимеразу (5 у/мкл (Fermentas, EPO282) из расчета 0.5 мкл Taq-полимеразы на одну реакцию. Пробирки центрифугировали при 8000g 1 минуту. Отбирали по 2 мкл супернатанта и помещали в пронумерованные стрипы набора Sigma. К стрипам с образцами добавляли по 23 мкл приготовленного раствора. В 3 стрипа добавляли по 2 мкл mQ-воды (отрицательный контроль). К стрипам, содержащим положительный контроль (cat. P9123), добавляли по 25 мкл раствора

№ 1. Инкубировали все стрипы в течение 5 мин при комнатной температуре. Использовали амплификатор (Bio-Rad, #PТС-0220G);

Программа:

1 цикл 94° С 2 мин

40 циклов 94° С 30 сек

55° С 30 сек

72° С 40 сек

Охладить до 4-8 °С

Готовили 1.2% агарозный гель:

0.6г агарозы (Helicon, LE-2);

50 мл 1X ТАЕ-буфера;

Добавляли 10 мкл бромида этидия. Залили раствор в камеру для горизонтального электрофореза с 2мя гребенками (Helicon, SE-2). Образцы из амплификатора вносили по 8 мкл в гель. Гель анализировали в трансиллюминаторе (Vilber-Lourmat, TCP-20.LM).

Трансфекция клеточной линии CHO-S

Процедуру проводили, используя липофильный агент FreeStyle MAX [Invitrogen] согласно инструкции производителя. Культуру клеток CHO-S за сутки до трансфекции выращивали до плотности $0,5 \cdot 10^6$ кл/мл. В день трансфекции определяли оптическую плотность культуры, клетки осаждали центрифугированием при 200 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Супернатант удаляли декантацией, клетки ресуспендировали в среде FreeStyle™ CHO Expression Medium [Invitrogen], содержащей 8 mM аланил-глутамина [Invitrogen] до конечной плотности $1,0 \cdot 10^6$ кл/мл. Суспензию клеток в равных долях помещали в центрифужные пробирки с коническим дном. Центрифугировали 3 минуты при 200g и $t = 24^{\circ}$ C. За 24 часа до трансфекции пассировали клетки CHO-S в новую культуральную среду до плотности 5×10^5 клеток/мл и выращивали при 120-130 rpm, 37°C, 8% CO₂.

Все используемые питательные среды перед применением прогревали в термостате до 37 ± 20 C. В среду для культивирования FreeStyle™ CHO Expression Medium вносили добавки: GlutaMAX (Invitrogen) и NT (Invitrogen) до концентрации 4 mM и 1%, соот-

ветственноПеред проведением трансфекции производили подсчет клеток в камере Горяева. Аккуратно перемешивали FreeStyle™ MAX Reagent переворачиванием пробирки с 4 раза. В лунке 96-и луночного планшета смешивали 10 мкл FreeStyle™ MAX Reagent и 150 мкл среды DMEM/F-12. Перемешивали плавным пипетированием и инкубировали на столе 3 минуты. [FreeStyle CHO-S Cells, Invitrogen, Cat. # R800-07]. К смеси добавляли препараты днк с концентрацией нуклеиновых кислот около 1 мкг/мл, плавно перемешивали 4 раза. Инкубировали на столе 20 минут. Готовую смесь вносили в клеточную суспензию, плавно перемешивая. Затем планшеты переносили в CO₂-инкубатор для культивирования в атмосфере 5%-ного углекислого газа при температуре 37° и влажности 95% в течение 18-24 часов. Эффективность трансфекции подсчитывали в камере Горяева.

Проверка моноклональности методом предельных разведений

Проверку моноклональности стабильных клонов - проводили методом предельных разведений. Для этого суспензию клеток в логарифмической фазе роста разводили средой SFM [Lonza, Швейцария] до плотности 2,5 клеток/мл и добавляли к каждому разведению кондиционированную среду до конечной концентрации 20% v/v. Суспензию разливали по 0,1 мл в лунки 96-луночных планшетов, используя по 10 планшетов на каждую суспензию. Планшеты помещали в CO₂-инкубатор для культивирования в атмосфере 5%-ного углекислого газа при температуре 37° и влажности 95% в течение 10- суток. После 10 суток, отбирали клеточную суспензию и ростовую среду в лунках в которых наблюдался рост. Поскольку число клеток, попавших в лунку, подчиняется распределению Пуассона, то вероятность отсутствия клональности. Рассчитывали количество клеток для разведения так, чтобы в 100 микролитрах культуральной жидкости находилось по 300 клеток. Разведенная до необходимой плотности клеточная суспензия по 100 микролитров переносилась в 96-ти луночные планшеты. Время роста – 2 недели.

Elisa анализ

Анализ продуктивности клонов IgG инфликсимаб проводился с использованием ИФА-набора Serazym IgG ELISA kit (Seramun, Германия). Для проведения ИФА анализа дарбэпоэтина использовали набор «Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ» («Вектор-БЕСТ», Рос-

сия) с калибровкой по препарату Аранесп (Amgen, США). Разведение для ИФА анализа бралось 50 000 раз. Анализ проводился в соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору реагентов «Вектор БЭСТ». Набор реагентов, включая планшет, прогревали до комнатной температуры в течение 30 мин. В лунки стрипов вносили по 100 мкл раствора для разведения. Готовили фосфатно-солевой буфер (ФСБ-Т) разведением 40 мл концентрата в 960 мл воды очищенной. Закрывали поверхность планшета липкой пленкой, входящей в состав набора, и инкубировали в течение 45 мин в термостатируемом шейкере с частотой 700 об/мин при 37 °С. По окончании инкубации снимали пленку, удаляли содержимое лунок. В каждую лунку вносили по 350 мкл ФСБ-Т, инкубировали 1 мин, удаляли содержимое. Повторили процедуру промывки 5 раз. По окончании промывки удалили остатки влаги из лунок планшета, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге. В каждую лунку внесли по 100 мкл раствора конъюгата. Закрывали поверхность планшета липкой пленкой, входящей в состав набора, и инкубировали в течение 30 мин в термостатируемом шейкере с частотой 600-800 об/мин при 37 °С. По окончании инкубации проводили промывку лунок планшета. В каждую лунку планшета вносили по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина. Помещали планшет со стрипами в защищенное от света место, инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Во все лунки планшета вносили по 100 мкл стоп-реагента. Измеряли оптическую плотность в лунках планшета на анализаторе при длине волны 450 нм, референсная длина волны 650 нм. Измерение проводили в течение 10 минут после внесения стоп-реагента. Концентрацию EYFP определяли Anti-GFP antibody Cat.# AV011(Евроген, Россия) согласно инструкциям производителя.

Проточная цитометрия Интенсивность флуоресценции оценивали на проточном цитометре Beckman Coulter Navios [Германия]. Параметры измерения были следующие: длина волны 488 нм, эмиссия 500 нм, количество событий 10 000. Результаты рассчитывали с помощью программы FlowJo 10.0.Br1. Автофлуоресценцию измеряли у исходной нетрансфицированной культуры, находящейся на той же стадии роста. Полученные значения вычитали как фоновые из флуоресценции EYFP-положительных пулов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Создание химерных конструкций, экспонирующих домены связывающие клетки с носителем на мембране

Чтобы экспонировать на поверхности клеточной мембраны участки белков, которые могут связываться с носителем – целлюлозой или металлом – были сконструированы химерные гены. Они состояли из последовательности, кодирующей целлюлозосвязывающий и/или металлсвязывающий домен, слитый с последовательностью трансмембранного фрагмента белка PDGFR и тег-последовательностью Мус. Целевая последовательность гена EYFP была соединена через IRES-элемент с синтетическим геном - маркером и соэкспрессировалась с одной последовательности. В таблице 3 приведены данные о механизме адсорбции клеток на носителях с помощью описанных химерных белков.

Таблица 3 - Схема действия химерных белков, закрепленных на мембране PDGFR доменом и связывающихся с разными типами носителя

Название конструкции	Химерная конструкция	Схема действия	Адгезия на носителе
CBD-EYFP+	CMVpr EYFP polyA EF1a pr CBD PDGFR polyA		Целлюлоза
TiBP-EYFP+	CMVpr EYFP IRES igg TiBP PDGFR polyA		Металлы, TiO ₂ , Si

Часть Мус-тега между трансмембранным доменом и участком связывания с носителем была добавлена в последовательность CBD-PDGFR векторной конструкции для повышения контрастности системы отбора и усиления различия между транс-

фектантами и нетрансформированными клетками. Клетки с более активной экспрессией данной конструкции получали дополнительное преимущество при сорбции из-за того, что в этом случае с сорбентом взаимодействовал более длинный химерный белок, экспонированный на тех частях мембраны, которые не касаются непосредственно носителя. что в этом случае с сорбентом взаимодействовал более длинный химерный белок, экспонированный на тех частях мембраны, которые не касаются непосредственно носителя. Исследовали адгезию на металлической поверхности пула клеток, экспрессирующих конструкцию [TiBP-EYFP+] – [металлсвязывающая последовательность], описанную в литературе как TiBP [17], и использующих ее в качестве связывающего домена. Контрольные конструкции для маркера селекции содержали только ген устойчивости генетицину. Конструкция для полученная клеточной линии инфлексимаба: Гены легкой и тяжелой цепи были поставлены под контроль промоторов равной силы. Гены, кодирующие легкую и тяжелую цепи МАТ инфликсимаб, были клонированы в экспрессионный вектор pVitroneo [InvivoGen, США], для получения экспрессионного вектора pVitroneo-Infliximab-LC-HC. Ген тяжелой цепи был соединен через IRES-элемент с геном, кодирующим маркер устойчивости к антибиотику G418. Таким образом, эти два гена транскрибировались в одну мРНК, с которой транслировались два белка, благодаря чему достигался более жесткий контроль экспрессии тяжелой цепи. Ген тяжелой цепи находился под контролем промотора CMVenh/rEF1, ген легкой цепи – под контролем промотора SV40/mEF1. (Рисунок 4)

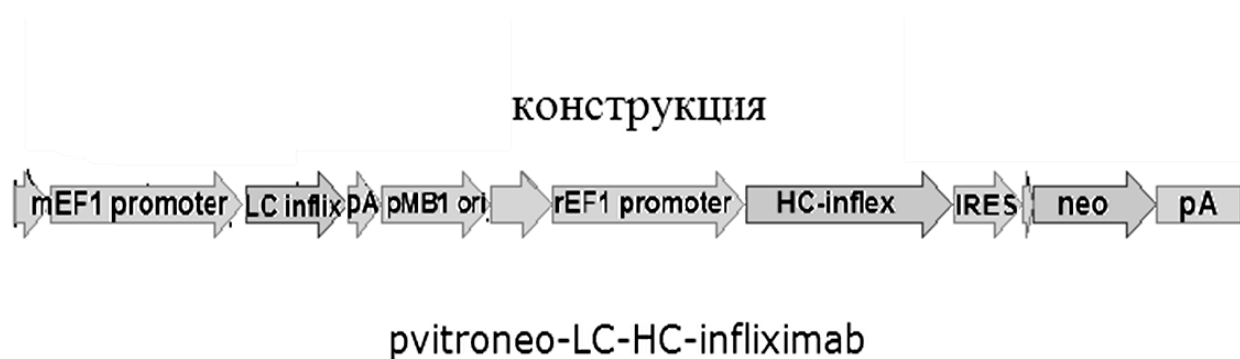


Рисунок 4 - Схема инженерной кассеты, содержащей полноразмерный инфликсимаб.

И генно-инженерная конструкция, содержащая кроме гена устойчивости к антибиотикам элементы раскрывающие хроматин. Она использовалась для создания клеточной линии продуцента дарбепоетина, содержала S/MAR в двух копиях в составе экспрессионного вектора pCI-neo (Рисунок 5).



Рисунок 5 - Схема инженерной кассеты, содержащей дарбэпоэтин.

Вектора экспрессии могут обладать различной способностью трансфицировать клетки из-за разного размера или формы. Чтобы низкая способность векторов поглощаться клеткой в достаточном количестве копий не стала препятствием для их использования, проверили эффективность трансфекции клетки-хозяина CHO-S для получения производительных клональных линий. Для этого провели серию трансфекций клеток CHO-s показав, что их трансфицируемость незначительно отличается от коммерческого (pEYFP+) и, этот параметр не является препятствием для их применения. Данные представлены (Таблица 4).

Таблица 4 - Характеристика клеток при трансфекции созданных векторов

Вектор	pEYFP+ n=20	pDEPO n=5	pINFLEX n=5	pCBD-EYFP+ n=20	pTiBP-EYFP+ n=10
Транзиентно трансфицированные клетки, %	30÷15	21÷11	8÷6	12÷8	12÷8
Жизнеспособные клетки, %	95÷2	95÷2	79÷2	94÷2	94÷2

Созданные конструкции содержали кандидаты на маркер селекции и сортировки и контрольные конструкции, использовавшие для отбора неомycin-трансферазу и влияющие на производительность конструкции S\MAR элементы.

4.2 Скрининг и оценка клонов при создании штамма-продуцента инфликсимаба методом предельных разведений. Получение клонов инфликсимаба методом предельных разведений

Оценив эффективность транзиторной трансфекции клеток CHO-S вектором Vitroneo-Infliximab-LC-NC по производительности LgG транзиторным пулом клеток, в качестве контроля использовали конструкцию pEYFP. Когда в ростовой среде транзиторного пула через 18-24 часа после внесения ДНК, накапливались моноклональные антитела в концентрации LgG в диапазоне от 80 до 320 мкг/мл, в зависимости от интенсивности трансфекции, клеточную суспензию распределяли по планшетах и методом предельных разведений выращивали клоны со стабильной трансфекцией трансгена. Рассчитывали количество клеток для разведения так, чтобы в 100 мкл культуральной жидкости находилось по 300 клеток. Разведенная до необходимой плотности клеточная суспензия по 100 мкл переносилась в 96-ти луночные планшеты. Через две недели, в лунках где в транзиторно трансфецированном пуле были клетки со встроенной в геном генной кассетой, наблюдали устойчивого к генетическому клеточного пула. Визуально отбирали пулы со стабильной трансфекцией по 60-80% конфлюэнтности. Измерение концентрации IgG в ростовой среде из лунок планшетов для клонирования проводили на четвертые сутки после трансфекции с помощью ИФА, по результатам которого концентрация инфликсимаба в культуральной жидкости составляла 7 мг на литр. Скрининг в 24 луночном планшете проводился в течение 4 суток, после чего было отобрано 18 клонов с продуктивностью не менее 1 мг/л для переноса в 6 луночный планшет для масштабирования. В шестилуночном планшете скрининг не проводился, все клоны, были перенесены во флаконы T25 и затем в колбы объемом 250 мл (Таблица 5).

Таблица 5 - Продуктивность и время удвоения клонов-продуцентов МАТ инфликсимаб при культивировании в течение 7 дней в колбах объемом 250мл

№ клона	Исходная клеточная плотность, $\times 10^6$ клеток/мл	Клеточная плотность на 4 сутки, $\times 10^6$ клеток/мл	Время удвоения, ч	Продуктивность, мг/л
1	0,2	3,6	23,02	7,8
3	0,2	2,6	25,94	14,25
4	0,3	1	55,27	13,8
5	0,2	1,7	31,09	9,4
7	0,2	1,7	31,09	24
8	0,2	2,7	25,57	9
9	0,3	2,1	34,20	18,8
10	0,3	3,6	26,78	13,1
11	0,3	3,6	26,78	3,75
12	0,2	2,1	28,30	1,9
13	0,3	3,4	27,41	13,5
14	0,2	2,3	27,25	22,5
15	0,2	3	24,57	54,4
16	0,2	2,8	25,21	7,5
17	0,2	2	28,90	9,6
18	0,2	2,2	27,75	16,8

Измерение концентрации IgG проводили на четвертые сутки после трансфекции с помощью ИФА, по результатам которого концентрация инфликсимаба в культуральной жидкости составило 7 мг на литр. Скрининг в 24 луночном планшете проводился в течение 4 суток, после чего по данным ИФА было отобрано 18 клонов с продуктивностью не менее 1 мг/л для переноса в 6 луночный планшет. В шести луночном планшете скрининг не проводился, все клоны, были перенесены во флаконы T25 и затем в колбы объемом 250 мл.

Время удвоения для большинства клонов находилось в диапазоне 25-35 часов, что являлось хорошим показателем для клеток, росших в стационарных условиях и не полностью адаптированных к культивированию с перемешиванием. После завершения культивирования (на 7 сутки) была измерена концентрация IgG в образцах культуральной жидкости при помощи ИФА, которая составила 1-50 мг/л. Распределение продуктивности отобранных клонов (Рисунок 6).

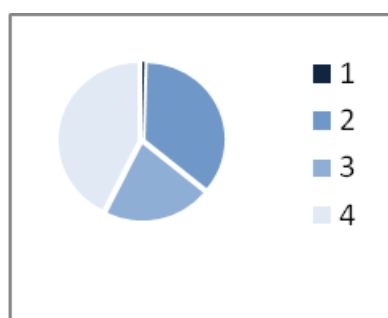


Рисунок 6 - Распределение количества клонов по продуктивности в трансфицированном пуле конструкцией, содержащей инфликсимаб. 1- сверхпродуктивные клоны (>100мг/л), 2- продуктивные клоны (>30, <100мг/л), 3-низкопродуктивные клоны (<30мг/л), 4- «молчащие» клоны.

Линейная зависимость в разнице продуктивности отдельных клонов на последнем этапе может говорить о влиянии только одного фактора на продуктивность, например, числа встроенных в геном копий, при условии, что они все находятся в одинаково хорошо транскрибируемых областях (Рисунок 7). Двухстадийный скрининг клонов выполнен методом предельных разведений. Лидирующий стабильный клон показал продуктивность в неоптимизированных условиях порядка 50 мг/л что около 30 раз больше средних значений в трансфицированном пуле. На втором этапе биохимического скрининга выборка клонов показала линейную зависимость в продуктивности, что может говорить о количестве копий, интегрированных в геном в одинаково хорошо транскрибируемых точках.

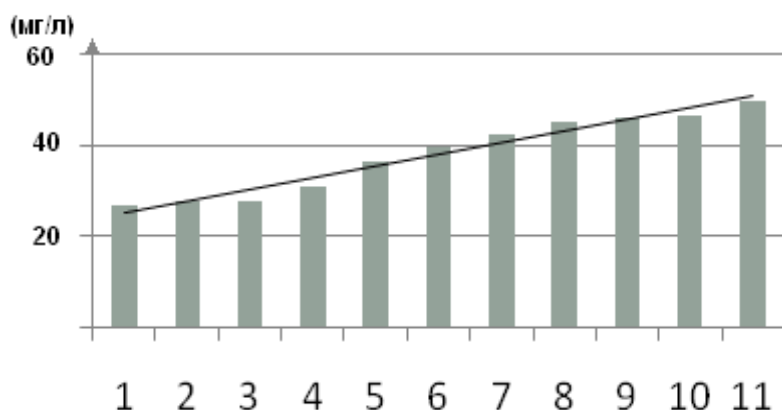


Рисунок 7 - Продуктивность лучших клонов при повторном скрининге. 1-11 номера клонов, 20-60 мг/л количество белка в культуральной жидкости на 5 день культивирования измеренное методом ИФА.

Затраты на поиск производительных клонов хорошо соотносятся с литературными данными. Двухэтапный биохимический скрининг для линий, полученных методом предельных разведений, был произведен за 3 месяца. Соотношение проанализированных клонов для поиска одного производительного составило 1\200.

4.3 Скрининг клонов при создании стабильной клеточной линии дарбэпоэтина с использованием S\MAR элемента

Генетическая конструкция, использованная для создания клеточной линии, содержала s/mar в двух копиях в составе экспрессионного вектора pCI-neo. Способность S/MAR увеличивать транскрипцию бала показана в зависимости от расстояния до соседних промоторов и энхансеров в интегративных векторах [Рисунок 8].



Рисунок 8 - Схема инженерной кассеты, содержащей дарбэпоэтин.

Коллекцию производительных клонов получали методом предельных разведений. Рассчитывали количество клеток для разведения так, чтобы в 100 мкл культуральной жидкости находилось по 300 клеток (Таблица 6). Разведенная до необходимой плотности клеточная суспензия по 100 мкл переносилась в 96-ти луночные планшеты. Время роста – 2 недели. Поскольку клеточный рост обнаруживался в 95 – 99% лунок, мы анализировали не моноклональные культуры, а смеси (минипулы), что позволило сократить количество используемых планшетов. Всего проанализировано 1248 минипула. Отобранные смеси клеток стабильной трансфекцией трансгена были перенесены в новый 96-ти луночный планшет, оставлены на подрост в течение 2-5 дней. Конфлюэнтность в лунках планшета выросла с 30-40% после переноса, до более 80% в течение 2-5 дней подроста. Затем проводили второй этап отбора. Было отобрано 32 минипула и внесено в новые 96-ти луночные планшеты. Ростовую среду анализировали по продуктивности с помощью ИФА анализа. В 96-ти луночный планшет вносили по 50 мкл суспензии с клетками и добавляли по 200 мкл свежей среды на лунку. Планшеты в CO₂ инкубаторе, оставляли на подрост в течение 2-х дней. По результатам ИФА отобрано 12 клонов, которые переносились в 6-ти луночный планшет с внесенной средой Power CHO-CD с добавками по 10% клеточной суспензии к свежей среде (200 мкл культуральной жидкости к 2 мл среды). Результаты приведены в виде Таблицы 6. Затем проводили второй этап отбора. Было отобрано 32 минипула. Отбирали пробы, анализировали по продуктивности с помощью ИФА анализа. В 96-ти луночный планшет среда с клетками добавляется по 200 мкл на лунку. Планшеты переносили в CO₂ инкубатор, и оставлены на подрост в течение 2-х дней. По результатам ИФА отобрано 12 клонов, которые переносились в 6-ти луночный планшет с внесенной средой Power CHO-CD с добавками по 10% клеточной суспензии к свежей среде (200 мкл культуральной жидкости к 2 мл среды). Результаты приведены в виде Таблицы 7. Для выравнивания клеток по скорости роста в планшетах рассчитывалась клеточная плотность и жизнеспособность. Клетки переносились в новый 6-ти луночный планшет с внесенной средой Power CHO-CD с добавками до конечной плотности 0,2-0,4 x10⁶ клеток в мл.

Таблица 6 - Схема разведения клеточной суспензии для получения моноклонов.

№ клона	КПх10 ⁶	Схема разведения
3	0,58	20 мкл развести в 10 мл среды, тщательно перемешать и 30 мкл полученной суспензии добавить в 40 мл кондиционной среды
7	0,37	20 мкл развести в 10 мл среды, тщательно перемешать и 50 мкл полученной суспензии добавить в 40 мл кондиционной среды
10	0,4	20 мкл развести в 10 мл среды, тщательно перемешать и 50 мкл полученной суспензии добавить в 40 мл кондиционной среды
20	0,27	20 мкл развести в 10 мл среды, тщательно перемешать и 40 мкл полученной суспензии добавить в 40 мл кондиционной среды
21	0,6	20 мкл развести в 10 мл среды, тщательно перемешать и 30 мкл полученной суспензии добавить в 40 мл кондиционной среды
23	0,8	20 мкл развести в 10 мл среды, тщательно перемешать и 25 мкл полученной суспензии добавить в 40 мл кондиционной среды

По результатам ИФА оставили 12 клонов, которые переносились в 6-ти луночный планшет с внесенной средой Power CHO-CD с добавками по 10% клеточной суспензии к свежей среде. Для выравнивания клеток по скорости роста в планшетах рассчитывалась клеточная плотность и жизнеспособность. Клетки переносились в новый 6-ти луночный планшет с внесенной средой Power CHO-CD с добавками до конечной плотности 0,2-0,4 х10⁶ клеток в мл. Продуктивность отобранных клонов (Рисунок 8). Если в конструкции присутствовал элемент, влияющий на хроматин, в исходной выборке можно увидеть фракцию клонов в 40 раз и более, отличавшихся от средних значений в пуле. Распределение продуктивности можно видеть на диаграмме (Рисунок 9).

Таблица 7 - Жизнеспособность субклонов-продуцентов дарбэпозтина после повторного раунда клонирования

№ клона	КПх10 ⁶	Жизнеспособность
3-1.2	0,8	88%
3-21.2	0,7	93%
3-26.2	0,5	78%
3-8.2	0,73	92%
7-8.1	1,4	95%
7-8.2	0,6	95%
7-9.2	0,4	90%
20-8.1	0,53	95%
20-9.2	0,5	69%
21-24.2	0,4	94%
23-16.2	0,4	90%

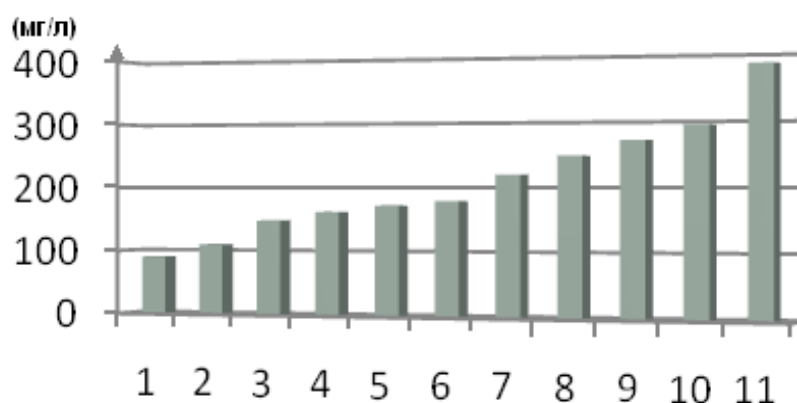


Рисунок 8 - Продуктивность лучших клонов на втором этапе скрининга. 1-11 номера клонов, 100-400 мг/л количество белка в культуральной жидкости на 5 день культивирования измеренное методом ИФА

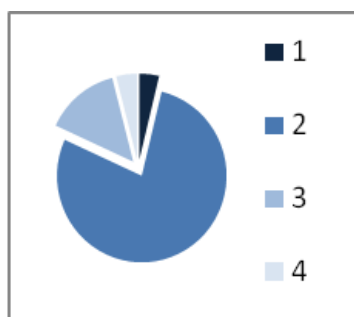


Рисунок 9 - Распределение продуктивности минипулов. 1 - сверхпродуктивные клоны >100мг/л, 2 - продуктивные клоны >30, <100мг/л, 3 - низкопродуктивные клоны, 4 - <30мг/л «молчащие» клоны

У лучшего клона был проведен анализ генетической стабильности. Транскрипт и хромосомная копия гена dEPOs1 соответствовала структурной части оптимизированного варианта гена дарбэпоэтина. Сравнение диаграмм первичного скрининга при получении рекомбинантных белков с использованием векторов с наличием S/MAR элемента и без, показало качественную разницу в трансфицированном пуле. Если в конструкции присутствовал элемент, влияющий на хроматин, в исходной выборке появлялась фракция клонов более чем на 40% отличавшихся от средних значений в пуле. Доля «молчащих» клонов – в которых экспрессия трансгена ниже, чем 1,5 раза от средних значений, составляла 3,9% от популяции. Конструкция без S/MAR элемента после интеграции создавала 37,5% «молчащих» клонов, что соответствует литературным данным.

Однако избавиться от масштабных затрат на первом этапе отбора не удалось. Также, временные затраты на первый этап скрининга не изменились, и составляли около 9 недель. Рекомбинантный белок, продуцируемый линиями, отобранными при двухступенчатом скрининге, показал высокое качество гликозилирования и стабильность. Результаты по его продуктивности подтверждаются данными ИФА и анализом продукции белка в культуральной жидкости. На втором этапе биохимического скрининга выборка клонов также показала линейную

зависимость в продуктивности. Затраты на поиск производительных клонов соотносятся с литературными данными, при этом они значительно ниже, чем в генетической конструкции, не содержащей S\MAR элемент. Соотношение проанализированных клонов для поиска одного производительного составило 1\20. Двухэтапный биохимический скрининг для линий, полученных методом предельных разведений, был произведен за 3 месяца.

4.4 Сорбция клеток на титановых кольцах

Чтобы тестировать созданный химерный маркер, несущий металл связывающий элемент, провели серию трансфекций и оценили способность вектора содержащего металлсвязывающую последовательность [TiBP-EYFP+] трансфицировать клетки. При эффективности трансфекции больше 10% было удобно визуально наблюдать адгезию клеток на металле (Рисунок 10) Предварительный эксперимент с титановыми кольцами добавленными в культуральную среду показал способность клеток, получивших трансген, собираться на поверхности металла. Чтобы оценить насколько это свойство можно использовать для отбора, мы рассчитали процент клеток, которые остаются на металле из-за увеличенной адгезии к поверхности металла. (Таблица 8) Обеднение исходного трансфицированного пула при переносе сорбента со связанными клетками в свежую среду. Результат сохранялся при нескольких последующих повторах процедуры декантации несвязанной клеточной суспензии. При этом, разница в адгезии для последующего отбора не давала преимущества для селекции. Заметных и воспроизводимых изменений количества трансфицированных вектором TiBP-EYFP+ клеток с высокой, по сравнению с исходным пулом, экспрессией не наблюдали. Результат сохранялся при нескольких последующих повторах процедуры декантации несвязанной клеточной суспензии. На 2-е сутки инкубации разница в связывании клеток с высокой экспрессией трансгена и нетрансфицированных клеток уже визуально не регистрировалась

Таблица 8 - Обеднение исходного трансфицированного пула при переносе сорбента со связанными клетками в свежую среду

Конструкция	Процент светящихся клеток относительно общего числа жизнеспособных		Процент светящихся клеток после переноса	
	Клеточная плотность $\times 10^6$	% светящихся клеток	Клеточная плотность $\times 10^6$	% светящихся клеток
TiBP-EYFP+	1,2	9,1%	1,32	4,16%
Контроль	2,2	12,2%	2,2	14,3%

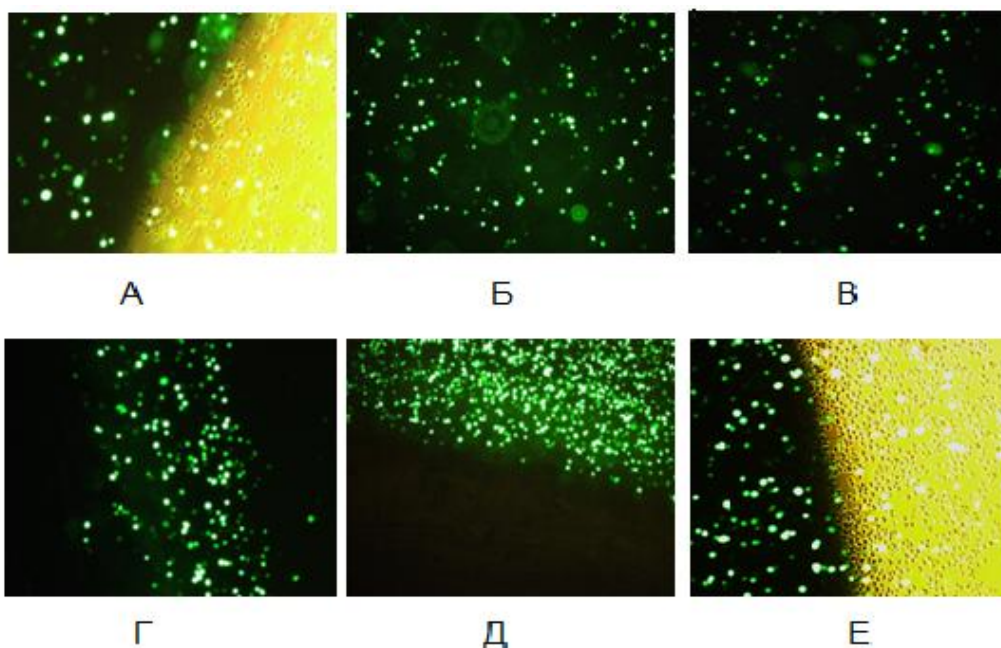


Рисунок 10 - Сорбция клеток на титановых кольцах. А, Б - пул клеток трансфицированный контрольной EYFP+ конструкцией в первый день, после трансфекции, В - пул трансфицированный контрольной конструкцией во второй день, после трансфекции. Г, Д - пул клеток трансфицированный целевой EYFP-TiBp конструкцией в первый день, после трансфекции, Е - пул трансфицированный EYFP-TiBp конструкцией во второй день, после трансфекции.

Это может быть связано с активной экспрессией кадгеринов при высоком клеточном титре на бессывороточной среде, следовательно, с усилением фоновой неспецифической сорбции. Адгезию могли также нивелировать глобулярные белки, высвобождаемые пулом в среду.

Опыт показал усиление адгезии с помощью созданного металлсвязывающего маркера, однако проявление этого свойства для селекции требовало другого носителя, чтобы различия в адгезии клеток активно экспрессировавших трансгенные конструкции и клеток не получивших, или слабо проявляющих конструкцию сохранялись в течение всего периода селекции.

4.5 Сорбция клеток на целлюлозной подложке

Полученные данные предварительно указывали на возможность проводить селекцию при помощи маркера, содержащего CBD-домен. Сильное устойчивое связывание трансфицированных клеток с волокнами целлюлозы обнаруживалось в случае, если целевая конструкция содержала CBD [Рисунок 11]. После переноса носителя с адсорбированными клетками в свежую среду большая часть связанных клеток, или 15–30% от общего количества клеток, использованных для трансфекции, оставалась на носителе. Этот показатель был сравним с показателем эффективности трансфекции, который составлял обычно 10–40%. Как и с поверхностью металла, оценили насколько адгезию на целлюлозе можно использовать для отбора, рассчитали процент клеток, которые остаются на целлюлозной подложке из-за увеличенной способности к связыванию с поверхностью. Обеднение исходного трансфицированного пула при переносе подложки со связанными клетками в свежую среду показано в таблице (Таблица 9). Разница в количестве трансфицированных клеток между исходным пулом и пулом клеток, связанных с подложкой, сохранялась даже после того, как трансфицированные клетки элиминировали трансгенный вектор, и переставали продуцировать флуоресцентный белок, что также можно было наблюдать при микроскопировании.

Таблица 9 - Обеднение исходного трансфицированного пула при переносе сорбента со связанными клетками в свежую среду

Конструкция	Процент светящихся клеток относительно общего числа жизнеспособных		Процент светящихся клеток после переноса	
	Клеточная плотность $\times 10^6$	% светящихся клеток	Клеточная плотность $\times 10^6$	% светящихся клеток
CBD-PDGFR	1,98	9,5%	2,31	4,3%
Контроль	2,2	12,2%	2,2	14,3%

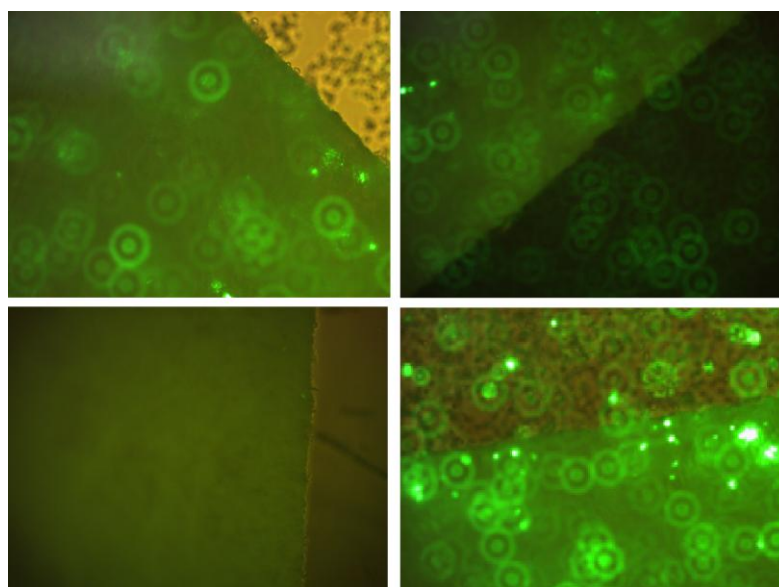


Рисунок 11 - Целлюлозная подложка в пуле клеток трансфицированных контрольной конструкцией EYFP+

Сложность в изучении селекции с использованием волокон целлюлозы обнаруживалась при переносе носителя с клетками на свежую среду, поскольку на носителе осаждались не только клетки EYFP+, но также и некоторая часть нетрансформированных клеток, обладавших, по-видимому, повышенной способностью к адгезии (Рисунок 12).

Пул клеток, адсорбированных на носителе, при культивировании в течение двух недель обогащался стабильными трансфектантами. Однако соотношение генномодифицированных клеток к клеткам дикого типа и было ниже, чем в исходном транзитном пуле, из-за высокой скорости роста непродуцируемых клеток.

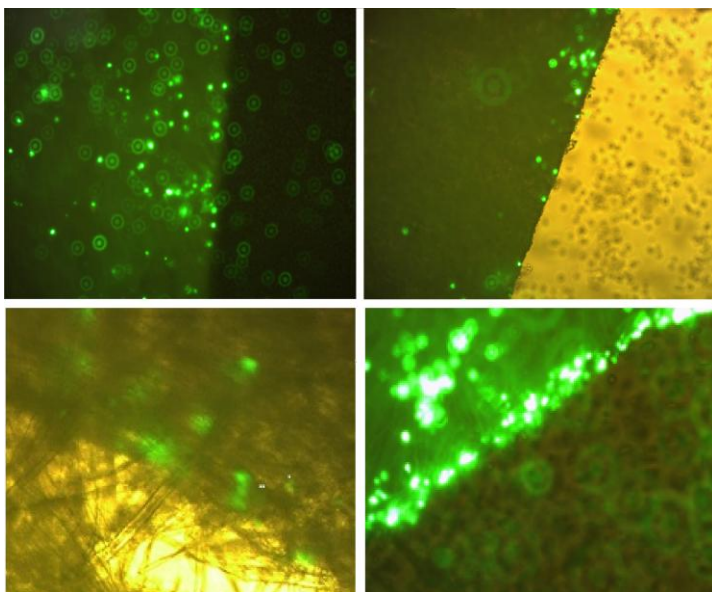


Рисунок 12 - Фотографии подложки в пуле клеток трансфицированных целевой конструкцией [CBD-EYFP+]

Специфичность отбора удалось кардинально улучшить в результате увеличения концентрации генетицина в среде до 600 мкг/мл и за счет более жесткого 3-кратного промывания носителя перед переносом на свежую ростовую среду один раз в 2 дня. Предварительные опыты с клетками, содержащими конструкцию с CBD-доменом, слитым с PDGFR геном, показал сильное связывание с волокнами целлюлозы. Достаточное количество ярко светящихся трансфектантов на носителе оставалось при эффективности трансфекции не ниже 10-12%. Один или два носителя размером 2x5мм инкубировали 2 часа в 2 мл трансфицированного пула на второй день после обработки. Тщательно отмывали носитель от несвязанных клеток, переносили в новую среду и фиксировали рост колоний на 8-й, 10-й и 14-й день после трансфекции (Рисунок 13). Колонии, отобранные на носителе в присутствии повышенного содержания генетицина, продолжали рост и демонстрировали стабильную,

высокую экспрессию EYFP белка. Выросшие клоны не расщеплялись по косвенному для адгезии признаку – экспрессии белка EYFP. Было проведено шесть серий трансфекций с количеством трансфицированных клеток не менее 500×10^3 клеток на точку.

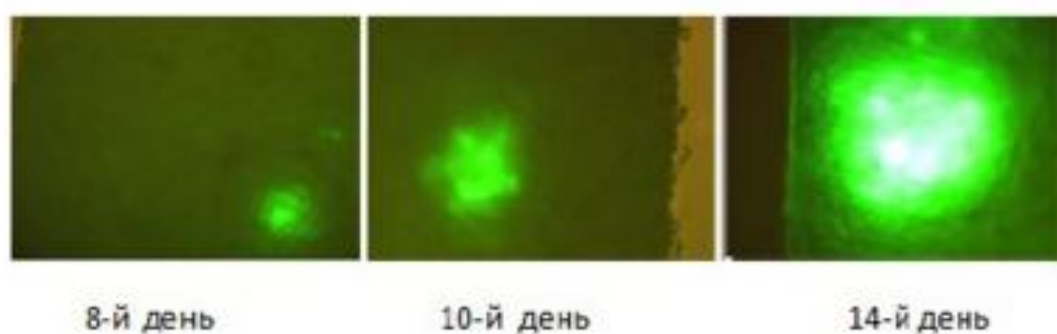


Рисунок 13 – Колонии, выросшие на целлюлозной подложке в трансфицированном пуле pCBD-EYFP+ в присутствии антибиотика.

В каждом случае на целлюлозной подложке отбиралось от одной до пяти светящихся колоний. Селекция с антибиотиком G418 в течение 2 недель позволила эффективно выделить и наработать биомассу позитивных клонов. Отбирали пробы и анализировали по продуктивности с помощью ИФА анализа. Для выравнивания клеток по скорости роста в планшетах рассчитывалась клеточная плотность и жизнеспособность. Сорбцию трансфектантов, содержащих целевые конструкции CBD-EYFP+, но не контрольных EYFP+ [светящиеся клетки на фрагменте носителя отсутствовали]. Колонии, отобранные на носителе в присутствии повышенного содержания генетицина, продолжали рост и демонстрировали стабильную, высокую экспрессию EYFP белка. (Рисунок 14) Как показали дальнейшие эксперименты, при переносе в среду, не содержащую антибиотик, клетки этих колоний обнаружили сохранившуюся способность к росту в суспензии. Полученные линии не показывали повышенную способность расти на поверхности флакона, или агрегации и сохраняли клеточную плотность в растущей культуре как у исходного штамма CHO-S

В то же время, анализ флуоресценции отобранных культур показал, что это стабильные трансфектанты, т.е. клоны не расщеплялись по косвенному для адгезии признаку – экспрессии белка EYFP.

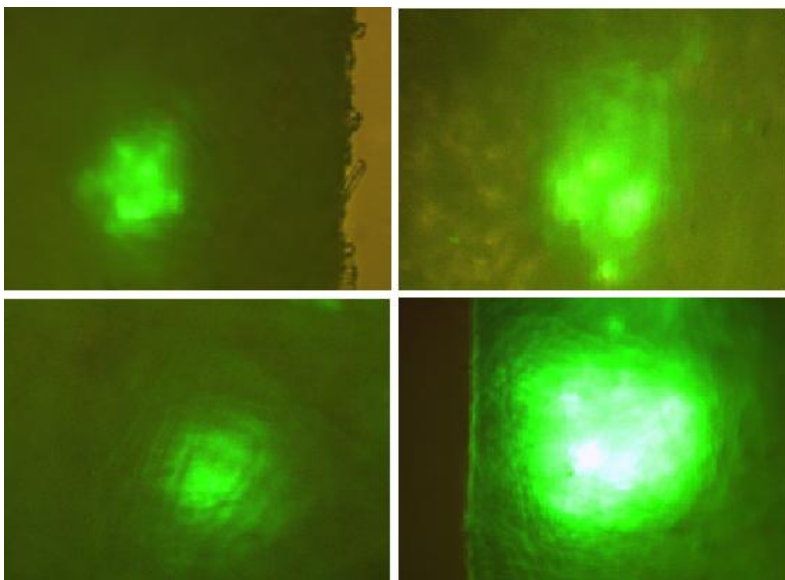


Рисунок 14 - Колонии, выросшие на целлюлозной подложке в трансфицированном пуле pCBD-EYFP+ в присутствии антибиотика

Для характеристики уровня экспрессии в отобранных клонах, а также структуру популяций [гетерогенность и стабильность отобранных линий], клоны были сняты с подложки и культивировались, как клеточные суспензии. Флуоресценцию измеряли на 20 и 35 пассаже после изоляции клеточных линий [Рисунок 15]. В качестве контроля и для нормирования экспрессии EYFP белка был взят пул клеток на четвертый день после трансфекции. Один клон показал существенную гетерогенность, что хорошо иллюстрируется изображениями, полученными во время анализа.

Таким образом, при использовании созданного маркера сортировки была получена ограниченная (12 клонов) выборка, без затрат первичный биохимический скрининг. Соотношение проанализированных клонов для поиска одного производительного составило 2\3 (Рисунок 16).

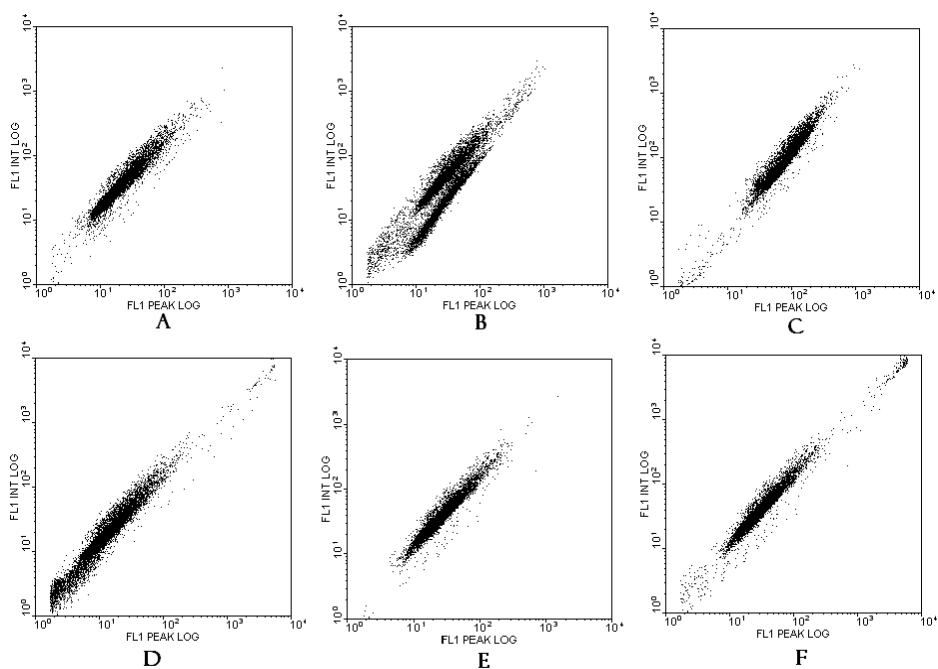


Рисунок 15 - Измерение флуоресценции клеточных суспензий с помощью проточной цитометрии. D – интенсивность флуоресценции у исходного трансфицированного пула; C – у клона с наибольшей интенсивностью флуоресценции; A, B, E, F – клеточные суспензии со средней интенсивностью свечения, соответственно.

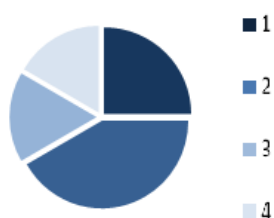


Рисунок 16 - Распределение количества клонов по продуктивности в трансфицированном пуле конструкцией, отобранной химерным сортином. 1- сверхпродуктивные клоны [>100 мг/л], 2- продуктивные клоны [>30 , <100 мг/л], 3- низкопродуктивные клоны [<30 мг/л], 4- «молчащие» клоны.

Продуктивность клонов, отобранных химерным сортином (Рисунок 17).

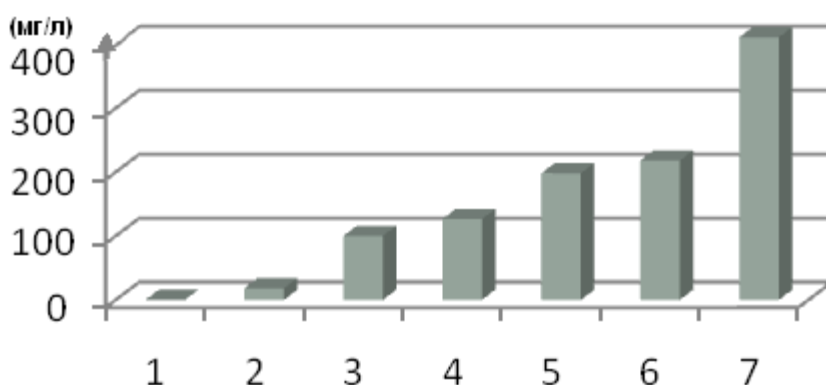


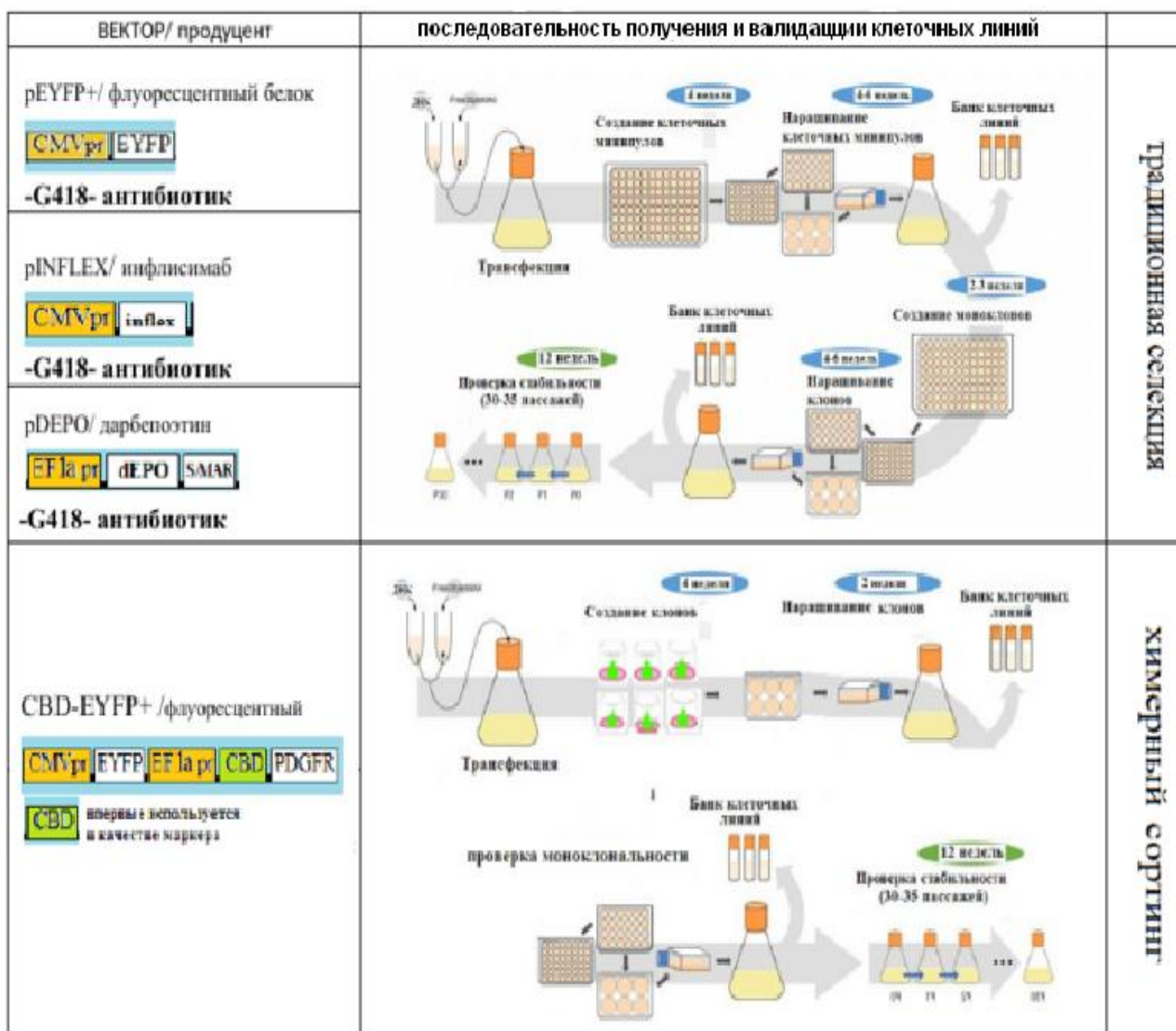
Рисунок 17 - Продуктивность лучших клонов после сортировки. 3-7 номера клонов, 100-400 мг/л количество белка - репортера EYFP в культуральной жидкости на 5 день культивирования измеренное методом ИФА.

Химерный сортировка был произведен за 2 недели. Селекция не потребовала второго раунда отбора. Доля сверхпродуктивных клонов составляла четверть стабильных линий, собранных для анализа. Расходные материалы для отбора были сокращены более, чем в четыре раза.

4.8 Сравнение схемы скрининга при использовании химерного сортировки с традиционными

При каждом скрининге мы получали представительную выборку клонов для последующего отбора и анализа по корректности гликозилирования, фолдинга и секреции. Отличие в продуктивности моноклональных линий от исходного пула в сорок и более раз мы получили при использовании S/MAR элемента или использования созданного маркера сортировки (Таблица 10). Стабильность клеточных линий усиливается за счет селекции в популяции генетически стабильных трансфектантов и самоуничтожения колоний, расщепляющихся при нестабильной экспрессии.

Таблица 10 - Изменение в схеме скрининга при химерном сортиге



Этап биохимической оценки полученной выборки клонов показал высокую продуктивность линий, полученных данным образом (Таблица 11). Затраты на поиск производительных клонов соотносятся с литературными данными для маркеров сортинга. Соотношение проанализированных клонов для поиска одного производительного составило 1\3. Отбор и биохимический анализ клональных линий выборки, полученных методом был произведен за 1,5 месяца.

Таблица 11 - Определение продуктивности у трех лучших клонов отобраными разными системами скрининга

Метод	№ клона	Концентрация целевого белка мг/л N=3 ($x \pm \sigma$)	Число живых клеток, $\times 10^6$ клеток/мл ($x \pm \sigma$)	Время удвоения, ч ($x \pm \sigma$)	Удельная продуктивность, пг/клетку/день ($x \pm \sigma$)
Метод предельных разведений + S/MAR	13	44,9 \pm 2,5	9,3 \pm 0,3	17,3 \pm 1,1	13,8 \pm 0,35
	17	48,2 \pm 3,1	7,9 \pm 0,5	18,1 \pm 1,2	14,2 \pm 0,24
	28	101,7 \pm 9,4	13,6 \pm 0,7	15,8 \pm 1,4	21,4 \pm 0,10
Химерный сортинг	10	72,7 \pm 3,2	7,2 \pm 0,3	19,7 \pm 1,1	19,4 \pm 0,44
	11	83,5 \pm 12,1	5,4 \pm 0,6	22,1 \pm 1,4	24,2 \pm 0,80
	12	380,4 \pm 14,5	5,6 \pm 0,5	22,2 \pm 1,2	76,1 \pm 0,66
Метод предельных разведений	15	54,4 \pm 4,4	5,0 \pm 0,9	24,6 \pm 1,6	8,4 \pm 0,13
	9	18,8 \pm 6,1	4,7 \pm 0,4	34,2 \pm 1,3	5,2 \pm 0,65
	18	16,8 \pm 9,2	3,6 \pm 0,5	27,8 \pm 1,3	4,9 \pm 0,34

Применение созданного химерного CBD-PDGFR-маркера селекции и сортинга приводит к быстрому отбору высокопродуктивных стабильных трансфектантов, что снижает затраты на получение коллекции продуктивных клеточных линий. Затраты на поиск производительных клонов соотносятся с литературными данными для маркеров сортинга. Затраты времени на отбор сократился более, чем в два раза. Затраты расходных материалов – более чем в четыре раза.

Таблица 12 - Сравнение нового способа отбора с традиционно применяемыми по временным и материальным затратам

ВЕКТОР/ продуцент	Расходные материалы и реактивы	Скорость скрининга до получения моноклональных линий
<p>pEYFP+/ флуоресцентный белок</p> <p>-G418- антибиотик</p>	<p>320 96-луночных планшета</p> <p>4 24-луночных планшета,</p> <p>10 6-луночных планшетов</p>	16 недель
<p>pINFLEX/ инфлисимаб</p> <p>-G418- антибиотик</p>	<p>15 ИФА наборов,</p> <p>10 литров бессывороточной среды</p>	
<p>pDEPO/ дарбэпоэтин</p>		
<p>pCBD-EYFP+ /флуоресцентный белок</p>	<p>10 6-луночных планшетов,</p> <p>4 24-луночных планшета,</p> <p>1 ИФА набор</p> <p>1 литр бессывороточной среды</p>	8 недель

ВЫВОДЫ

- 1) Созданы химерные гены TiBP-PDGFR и CBD-PDGFR, белковые продукты которых сообщают продуцирующим их клеткам связываться с носителями – титаном и целлюлозной подложкой
- 2) Показана возможность дифференцированной селекции на целлюлозной подложке маркером CBD-PDGFR
- 3) Получена серия стабильных продуктивных клональных линий при помощи химерного белка CBD-PDGFR
- 4) Серия клональных линий охарактеризована по продуктивности гена-маркера, стабильности и скорости роста биохимическими методами и методами культивирования
- 5) Проведено сравнение нового способа отбора с традиционно применяемыми при создании клеточных линий. Показано, что применение созданного химерного CBD-PDGFR-маркера приводит к быстрому отбору высокопродуктивных стабильных клональных линий трансфектантов

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Теоретические выкладки данного исследования позволили создать полноценную технологию селекции и сортировки на основе клеточного дисплея. Созданная система представляет собой гибрид из селекции на носителе, дифференцированном отборе клеток с помощью оценки инструментальными методами соэкспрессируемого белка и методы отбора клонов. Сравнение нескольких систем отбора, показывает перспективность использования модифицированной системы селекции и сортировки позволяет сократить затраты времени и расходных материалов более чем в 2 раза. Преимущества в скорости дает возможность проверять моноклональность пула, полученного из одной колонии параллельно с другими методами оценки коллекции созданных клеточных линий.

В практическом плане, проведенные исследования могут найти применение при получении клеточных линий эукариот различного применения: создание коллекций линий продуцирующих рекомбинантные белки, создание подготовленной линии для отбора клеток с не измененной системой гликозилирования и фолдинга для последующего получения продуцирующих линий с использованием систем гомологичной рекомбинации. Так же, данную систему отбора можно использовать в доклинических исследованиях с лабораторными животными при работе с клетками, подвергающимися генетическим модификациям.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- 1A(IF1 α) - фактор элонгации
- ACE - система экспрессии искусственная хромосома на целевом векторе
- Actb – актин В
- ADCC - антителозависимая клеточная цитотоксичность
- CAI - индекс адаптации кодона
- CHO - клетки яичников китайского хомячка
- CHO-K1 - адгезивная линия CHO клеток
- CHO-S - суспензионная линия CHO клеток
- CMV - цитомегаловирус
- DG44 - линия CHO клеток с нокаутом DHFR гена
- DHFR - дигидрофолатредуктаза
- EGFP - улучшенный зеленый флуоресцентный белок
- EASE – усиливающие экспрессию элементы последовательности
- ELISA, ИФА - иммуноферментный анализ
- ER - эндоплазматический ретикулум
- FACS - флуоресцентно активированная сортировка клеток
- FDA - управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США
- FUT8 - α 1,6-фукозилтрансфераза 8
- G418 - генетицин
- GFP -зеленый флуоресцентный белок
- GS - глутаминсинтаза
- IRES - сайт внутреннего входа рибосомы
- IVCD - интегральная плотность жизнеспособных клеток
- LC – легкая цепь антитела
- LgG – иммуноглобулин G класса
- LNGFR - рецептор фактора роста нервов
- MACS - магнитно-активированная сортировка клеток
- NMP - ядерные матричные белки

ORF - открытая рамка считывания
PCD - пикограмм/клетка/день
PDGFR – рецептор тромбоцитарного фактора роста
RGEN - инженерные нуклеазы опосредованные рибонуклеиновой кислотой
S/MAR - скаффолд и матрикс связывающие области (элементы)
SATB1 - глобальный организатор хроматина и фактор транскрипции
SFM – бессывороточная среда
SV40 – обезьяний вирус 40
TAI – индекс вклада кодонов
TALEN - эффекторная нуклеаза, подобная активаторам транскрипции
tracrRNA - транскрибирующая рибонуклеиновая кислота
UCOE - универсальные элементы открывающие хроматин
UTR - нетранслируемая область
XBP-1 - X-Box - связывающий белок 1
ZFN - нуклеаза цинковых пальцев
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
НС - тяжелая цепь антитела
ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
МАТ – моноклональное антитело
MBP - белок взаимодействующий с матрикс связывающей областью
мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота
MTS - метионинсульфоксимин
MTX - метотрексат
MTX-F - метотрексат меченный флуоресцеин изотиоцианатом
НЕК 293 - клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека
НРС - метод предельных разведений
AMEGA - система амплификации антиген-опосредованных генетически модифицированных клеток
тРНК - транспортная рибонуклеиновая кислота
ЦНС – центральная нервная система

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Karaivanova, V.K. Processing of viral envelope glycoprotein by the endomannosidase pathway: evaluation of host cell specificity./ V.K. Karaivanova, P. Luan, R.G. Spiro // *Glycobiology*. 1998.- №579 - P.725-730
2. Kim, J.Y. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential./ J.Y. Kim, Y.G. Kim, G.M Lee // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012.- №93 - P.917–930
3. Ghaderi, D. Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. / D. Ghaderi, M. Zhang, N. Hurtado-Ziola, A. Varki // *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2012.- №28 - P.147–175
4. Wiberg, F.C. Production of target-specific recombinant human polyclonal antibodies in mammalian cells. / F.C.Wiberg, S.K. Rasmussen, T.P. Frandsen, L.K. Rasmussen, et al.// *Biotechnol. Bioeng.* 2006. - №94 - P.396–405
5. <http://pharmapractice.ru/94109>
6. Lanthier, M. Economic issues with follow-on protein products./ M. Lanthier, R. Behrman, C. Nardinelli// *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008. - №7 - P.733–737.
7. Kaufman, R.J. Amplification and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary dna gene. / R.J. Kaufman, P.A. Sharp // *J. Mol. Biol.* 1982. - №150 - P.601–621.
8. Chu, L. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture./ L. Chu, D.K. Robinson // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001. - №12 - P.180–187.
9. Bebbington, C.R. High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker./ C.R. Bebbington, G. Renner, S.Thomson, D. King, D. Abrams, G.T. Yarranton // *Biotechnology* 1992. - №10 - P.169–175.
10. Browne, S.M. Selection methods for high-producing mammalian cell lines./ S.M. Browne, M. Al-Rubeai // *Trends Biotechnol.* 2007. - №25 - P.425–432.
11. Wigler, M. Transformation of mammalian cells with an amplifiable dominant-acting gene./ M. Wigler, M. Perucho, D. Kurtz, S. Dana, A. Pellicer, R. Axel, S. Silverstein// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980. - №77 - c 3567–3570
12. Klein, R.L. Neuron-specific transduction in the rat septohippocampal or nigrostriatal pathway by recombinant adeno-associated virus vectors./ R.L. Klein, E.M. Meyer, A.L.Peel, S. Zolotukhin, C. Meyers et al. // *Exp Neurol.* 1998. - №150[2] - P.183-94.

13. McCown, T.J. Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an adeno-associated virus [AAV] vector./ T.J. McCown, X. Xiao, J. Li, G.R. Breese, R.J.Samulski // *Brain Res.* 1996. - №25- P.99-107.
14. Francastel, C. Nuclear compartmentalization and gene activity./ C. Francastel, D. Schübeler, D.I. Martin, M. Groudine // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000. - №1[2]- P.137-43.
15. Yew, N.S. Controlling the kinetics of transgene expression by plasmid design./ N.S.Yew // *Adv Drug Deliv Rev.* 2005. - №57[5] - P.769-80.
16. Xiaoyin, W. The EF-1 α promoter maintains high-level transgene expression from episomal vectors in transfected CHO-K1 cells./ W. Xiaoyin, X. Zhongjie, T. Zhengwei, et al.// *J Cell Mol Med.* 2017. - № 21[11] - P.3044–3054.
17. Pontiller, J. Identification of CHO endogenous promoter elements based on a genomic library approach./ J. Pontiller, S. Gross, Thaisuchat H, Hesse F, et al. // *Mol Biotechnol.* 2008. - № 39[2] - P.135-139.
18. Pontiller, J. Identification of CHO Endogenous Promoter Elements Based on a Genomic Library/ J. Pontiller, S. GrossHaruthai, T. Friedemann, H. Wolfgang Erns// *Approach* June 2008. - № 39(2) - P.135–139.
19. Mirkovitch, J. Organization of the higher-order chromatin loop: Specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. / Mirkovitch J., Mirault M.E., Laemmli U.K // *Cell.* 1984. - № 39– P.223–232.
20. Jost, J.P. 5-Methylcytosine DNA glycosylase participates in the genome-wide loss of DNA methylation occurring during mouse myoblast differentiation./ J.P. Jost, E.J. Oakeley, B. Zhu, D. Benjamin, et al.// *Nucleic Acids Res.* 2001. - № 29– P.4452–4461.
21. Zhu, B. Overexpression of 5-methylcytosine DNA glycosylase in human embryonic kidney cells EcR293 demethylates the promoter of a hormone-regulated reporter gene./ B. Zhu, D. Benjamin, Y. Zheng, H. Angliker, S. Thiry, et al.// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. - № 98 - P.5031–5036.
22. Girod, P.A. Genome-wide prediction of matrix attachment regions that increase gene expression in mammalian cells. / P.A. Girod, D.Q. Nguyen, D. Calabrese, S. Puttini et al. // *Nat. Methods.* 2007. - № 4 - P.747–753.
23. Bell, A.C. The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators./ A.C. Bell, A.G. West, G. Felsenfeld // *Cell.* 1999. - № 98 - P.387–396.
24. Bidwell, J.P. Involvement of the nuclear matrix in the control of skeletal genes: The NMP1 [YY1], NMP2 [Cbfa1], and NMP4 [Nmp4/CIZ] transcription factors./ J.P. Bidwell, K. Torrungruang, M. Alvarez, S.J. Rhodes et al.// *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2001. - № 11 - P.279–297.
25. Girod, P.A. Use of the chicken lysozyme 5' matrix attachment region to generate high producer CHO cell lines./ P.A. Girod, M. Zahn-Zabal, N. Mermoud // *Biotechnol. Bioeng.* 2005. - № 91 - P.1–11.

26. Kim, J.M. Improved recombinant gene expression in CHO cells using matrix attachment regions./ J.M. Kim, J.S. Kim, D.H. Park, H.S. Kang, et al. // *J. Biotechnol.* 2004. - № 107- P.95–105.
27. Kim, J.D. Efficient selection of stable chinese hamster ovary [CHO] cell lines for expression of recombinant proteins by using human interferon beta SAR element./ J.D.Kim, Y. Yoon, H.Y. Hwang, J.S. Park, et al. // *Biotechnol. Prog.* 2005. - № 21 - P.933–937.
28. Zahn-Zabal, M. Development of stable cell lines for production or regulated expression using matrix attachment regions./ M. Zahn-Zabal, M. Kobr, P.A. Girod, M. Imhof, P. Chatellard, et al. // *J. Biotechnol.* 2001. - № 87 - P.29–42.
29. Zuckerkandl, E. Generation of high specificity of effect through low-specificity binding of proteins to DNA./ E. Zuckerkandl, R.Villet // *FEBS Lett.* 1988. - №231[2] – c 291-298.
30. Conlon, T.M. The chicken Ig light chain 3'-enhancer is essential for gene expression and regulates gene conversion via the transcription factor E2A./ T.M. Conlon, K.B. Meyer // *Eur J Immunol.* 2006. - № 36 - P.139–48.
31. Kim, H.Y. Use of DNA insulator elements and scaffold/matrix-attached regions for enhanced recombinant protein expression./ H.Y. Kim // *Cell Culture and upstream processing.* 2007. - P.19–36
32. Bode, J. Transcriptional augmentation: Modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions [S/MAR elements]./ J. Bode, C. Benham, A. Knopp, C. Mielke// *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2000. - № 10 - P.73–90.
33. Shübeler, D. Scaffold/matrix-attached regions act upon transcription in a context-dependent manner./ D. Shübeler, C. Mielke, K. Maass, J. Bode // *Biochemistry.* 1996. - № 35 - P.11160–11169.
34. Evans, K.J. Strand bias structure in mouse DNA gives a glimpse of how chromatin structure affects gene expression./ Evans, K.J.// *BMC Genomics.* 2008. - № 9 - P.16.
35. Aerts, S. Comprehensive analysis of the base composition around the transcription start site in Metazoa. / S. Aerts, G. Thijs, M. Dabrowski, Y. Moreau, B. De Moor // *BMC Genomics.* 2004. - № 5 - P.34.
36. Dickinson, L.A. A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition./ L.A. Dickinson, T. Joh, Y. Kohwi, T. Kohwi-Shigematsu // *Cell* 1992. - № 70 - P.631–645
37. Galande, S. The third dimension of gene regulation: organization of dynamic chromatin loopscape by SATB1./ S. Galande, P.K. Purbey, D. Notani, P.P. Kumar // *Current Opin Genet Dev.* 2007. - № 17 - P.408–14.
38. Han, H.J. SATB1 reprograms gene expression to promote breast tumour growth and metastasis. / H.J. Han, J. Russo, Y. Kohwi, T. Kohwi-Shigematsu // *Nature.* 2008. - № 452 - P.187–93.

39. FitzPatrick, D.R. Identification of SATB2 as the cleft palate gene on 2q32–q33./ D.R. FitzPatrick, I.M. Carr, L. McLaren, J.P. Leek, P. Wightman, et al. // *Hum Mol Genet.* 2003. - № 12 - P.2491–2501.
40. Britanova, O. Novel transcription factor Satb2 interacts with matrix attachment region DNA elements in a tissue-specific manner and demonstrates cell-type-dependent expression in the developing mouse CNS./ O. Britanova, S. Akopov, S. Lukyanov, P. Gruss, V. Tarabykin // *Eur J Neurosci.* 2005. - № 2 - P.658–668
41. https://www.researchgate.net/publication/47405799_Characterization_of_the_Drosophila_Scaffold_Attachment_Factor_B_SAFB
42. Benton, T. The use of UCOE vectors in combination with a preadapted serum free, suspension cell line allows for rapid production of large quantities of protein./ T. Benton, T. Chen, M. McEntee, B. Fox // *Cytotechnology.* 2002. - № 38 - P.43–46.
43. De Poorter, J.J. Optimization of short-term transgene expression by sodium butyrate and ubiquitous chromatin opening elements [UCOEs]. / J.J. De Poorter, K.S. Lipinski, R.G. Nelissen, T.W. Huizinga, R.C. Hoeben // *J. Gene Med.* 2007. - № 9 - P.639–648.
44. Ye, J. Rapid protein production using CHO stable transfection pools./ Ye J., Alvin K., Latif H., Hsu A., Parikh V., et al. // *Biotechnol. Prog.* 2010. - № 26 - P.1431–1437.
45. Jia, Q. A “GC-rich” method for mammalian gene expression: A dominant role of non-coding DNA GC content in regulation of mammalian gene expression. / Jia, Q., Wu H., Zhou X., Gao J., et al. // *Sci. China Life Sci.* 2010. - № 53 - P.94–100.
46. Cao, H. TGGA repeats impair nucleosome formation./ H. Cao, H.R. Widlund, T. Simonsson, M. Kubista // *J. Mol. Biol.* 1998. - № 281 - P.253–260.
47. Lowary, P.T. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning./ P.T. Lowary, J. Widom // *J. Mol. Biol.* 1998. - № 276 - P.19–42.
48. Levitsky, V.G. RECON: A program for prediction of nucleosome formation potential. / V.G. Levitsky // *Nucleic Acids Res.* 2004. - № 32 - P.346–349.
49. Gustafsson, C. Codon bias and heterologous protein expression./ C. Gustafsson, S. Govindarajan, J. Minshull // *Trends Biotechnol.* 2004. - № 22 - P.346–353.
50. Pedersen, S. Patterns of protein synthesis in *E. coli*: a catalog of the amount of 140 individual proteins at different growth rates. / S. Pedersen, P.L. Bloch, S. Reeh, F.C. Neidhardt. // *Cell.* 1978. - № 14 - P.179–190.
51. Bonomo, J. Amino acid content of recombinant proteins influences the metabolic burden response./ J. Bonomo, R.T. Gill // *Biotechnol Bioeng.* 2005. - № 90 - P.116–126.

52. Gong, M. Overexpression of *tnaC* of *Escherichia coli* inhibits growth by depleting tRNA^{Pro} availability. / M. Gong, F. Gong, C. Yanofsky // *J Bacteriol.* 2006. - № 188 - P.1892–1898.
53. Harcum, S.W. Structured model to predict intracellular amino acid shortages during recombinant protein overexpression in *E. coli*. / S.W. Harcum // *J Biotechnol.* 2002. - № 93- P.189–202.
54. Rojiani, M.V. Relationship between protein synthesis and concentrations of charged and uncharged tRNA^{Trp} in *Escherichia coli*. / M.V. Rojiani, H. Jakubowski, E. Goldman // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990. - № 87 - P.1511–1515.
55. Wu, G. SGDB: a database of synthetic genes re-designed for optimizing protein overexpression. / G. Wu, Y. Zheng, I. Qureshi, H.T. Zin, T. Beck, B. Bulka, S.J. Freeland // *Nucleic Acids Res.* 2007. - № 35 - P.D76–D79.
56. Kudla, G. Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. / G. Kudla, A.W. Murray, D. Tollervey, J.B. Plotkin // *Science.* 2009. - № 324 - P.255–258.
57. Welch, M. Design parameters to control synthetic gene expression in *Escherichia coli*. / M. Welch, S. Govindarajan, J.E. Ness, A. Villalobos, et al. // *PLoS ONE.* 2009. - № 4 - P.7002.
58. Allert, M. Multifactorial determinants of protein expression in prokaryotic open reading frames. / M. Allert, J.C. Cox, H.W. Hellinga // *J Mol Biol.* 2010. - № 402 - P.905–918.
59. Stewart, L. Whole gene synthesis: A Gene-O-Matic future. / L. Stewart, A.B. Burgin // *Frontiers in Drug Design & Discovery.* 2005. - № 1 - P.297–341.
60. Plotkin, J.B. Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. / J.B. Plotkin, G. Kudla // *Nature reviews Genetics.* 2011. - № 12 - P.32–42.
61. Welch, M. You're one in a googol: optimizing genes for protein expression. / M. Welch, A. Villalobos, C. Gustafsson, J. Minshull // *J R Soc Interface.* 2009. - № 6[Suppl 4] - P.S467–S476.
62. Gustafsson, C. Tools designed to regulate translational efficiency. In: Smolke CD, editor. *The Metabolic Pathway Engineering Handbook: Tools and Applications.* / C. Gustafsson // CRC Press; 2009 г. - P.1–14.
63. Ehretsmann, C.P. Specificity of *Escherichia coli* endoribonuclease RNase E: in vivo and in vitro analysis of mutants in a bacteriophage T4 mRNA processing site. / C.P. Ehretsmann, A.J. Carpousis, H.M. Krisch // *Genes & Development.* 1992. - № 6 - P.149–159.
64. G. Cannarozzi, N.N. A role for codon order in translation dynamics. / G. Cannarozzi, N.N. Schraudolph, M. Faty, P. von Rohr, M.T. Friberg // *Cell.* 2010. - № 141 - P.355–367.
65. Boycheva, S. Codon pairs in the genome of *Escherichia coli*. / S. Boycheva, G. Chkodrov, I. Ivanov // *Bioinformatics.* 2003. - № 19 - P.987–998.
66. Friberg, M. Limitations of codon adaptation index and other coding DNA-based features for prediction of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. / M. Friberg, P. von Rohr, G. Gonnet // *Yeast.* 2004. - № 21 - P.1083–1093

67. Angov, E. Codon usage: nature's roadmap to expression and folding of proteins. / E. Angov // *Biotechnology journal*. 2011. - № 6 - P.650–659.
68. Siller, E. Slowing bacterial translation speed enhances eukaryotic protein folding efficiency. / E. Siller, D.C. DeZwaan, J.F. Anderson, B.C. Freeman, J.M. Barral // *J Mol Biol*. 2010. - № 396 - P.1310–1318.
69. Proudfoot, N.J. Ending the message: poly[A] signals then and now. / Proudfoot N.J. // *Genes Dev*. 2011. - № 25 - P.1770–1782.
70. Kane, J.F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. / J.F. Kane // *Curr Opin Biotechnol*. 1995. - № 6 - P.494–500.
71. Burgess-Brown, N.A. Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. / N.A. Burgess-Brown, S. Sharma, F. Sobott, C. Loenarz, U. Oppermann, O. Gileadi // *Protein expression and purification*. 2008. - № 59 - P.94–102.
72. Wu, X. Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in *Escherichia coli*: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance. / X. Wu, H. Jörnvall, K.D. Berndt, U. Oppermann // *Biochem Biophys Res Commun*. 2004. - № 313 - P.89–96.
73. Tegel, H. Enhancing the protein production levels in *Escherichia coli* with a strong promoter. / H. Tegel, J. Ottosson, S. Hober // *The FEBS journal*. 2011. - № 278 - P.729–739.
74. Hayes, C. Stop codons preceded by rare arginine codons are efficient determinants of SsrA tagging in *Escherichia coli*. / C. Hayes, B. Bose, R. Sauer // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002. - № 99 - P.3440–3445.
75. Spanjaard, R.A. Translation of the sequence AGG-AGG yields 50% ribosomal frameshift. / R.A. Spanjaard, J. van Duin // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988. - № 85 - P.7967–7971.
76. Sorensen, M.A. Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. / M.A. Sorensen, C.G. Kurland, S. Pedersen // *J Mol Biol*. 1989. - № 207 - P.365–377.
77. Wurm, F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. / F.M. Wurm // *Nat. Biotechnol*. 2004. - № 22 - P.1393–1398.
78. Fussenegger, M. Genetic optimization of recombinant glycoprotein production by mammalian cells. / M. Fussenegger, J.E. Bailey, H. Hauser, P.P. Mueller // *Trends Biotechnol*. 1999. - № 17 - P.35–42.
79. Baird, S.D. Searching for IRES. / S.D. Baird, M. Turcotte, R.G. Korneluk, M. Holcik // *RNA*. 2006. - № 12 - P.1755–1785.

80. Ho, S.C. IRES-mediated Tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing CHO cell lines./ S.C. Ho, M. Bardor, H. Feng, Y.W. Tong, Z. Song, M.G. Yap, Y. Yang// *J. Biotechnol.* 2012. - № 157 - P.130–139.
81. Trill, J.J. Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells./ J.J. Trill., A.R. Shatzman, S. Ganguly // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1995. - № 6 - P.553–560.
82. Ng, S.K. Vector fragmentation: Characterizing vector integrity in transfected clones by Southern blotting. / S.K. Ng, W. Lin, R. Sachdeva, D.I. Wang, M.G. Yap // *Biotechnol. Prog.* 2010. - № 26 - P.11–20.
83. Kaufman, R.J. Improved vectors for stable expression of foreign genes in mammalian cells by use of the untranslated leader sequence from EMC virus. / R.J. Kaufman, M.V. Davies, L.C. Wasley., D. Michnick // *Nucleic Acids Res.* 1991. - № 19 - P.4485–4490.
84. Rees, S.. Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein./ S. Rees, J. Coote, J. Stables, S. Goodson, S. Harris, M.G. Lee// *Biotechniques.* 1996. - № 20 - P.102–110.
85. Gurtu, V. IRES bicistronic expression vectors for efficient creation of stable mammalian cell lines./ V. Gurtu, G. Yan, G. Zhang// *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. - № 229 - P.295–298.
86. Kolb, A.F. Expression of a recombinant monoclonal antibody from a bicistronic mRNA./ A.F. Kolb, S.G. Siddell// *Hybridoma.* 1997. - № 16 - P.421–426.
87. Novo, J.B. Generation of a Chinese hamster ovary cell line producing recombinant human glucocerebrosidase./ J.B. Novo, L. Morganti, A.M. Moro, A.F. Paes Leme, S.M. Serrano, I.Raw, P.L. Ho// *J. Biomed. Biotechnol.* 2012. - c.875383.
88. Ng, S.K. Production of Functional Soluble Dectin-1 Glycoprotein Using an IRES-Linked Destabilized-Dihydrofolate Reductase Expression Vector./ S.K. Ng, T.R. Tan, Y. Wang, D. Ng, L.T. Goh, M. Bardor, V.V. Wong, K.P. Lam// *PLoS One.* 2012. - № 7 - P.52785.
89. Kennard, M.L Engineered mammalian chromosomes in cellular protein production: Future prospects./ M.L. Kennard// *Methods Mol. Biol.* 2011. - № 738 - P.217–238.
90. Kennard, M.L. The generation of stable, high MAB expressing CHO cell lines based on the artificial chromosome expression [ACE] technology./ M.L. Kennard, D.L. Goosney, D. Monteith, L. Zhang, M. Moffat, D. Fischer, J. Mott // *Biotechnol. Bioeng.* 2009. - № 104 - P.540–553.
91. Dejong, G. Mammalian artificial chromosome pilot production facility: Large-scale isolation of functional satellite DNA-based artificial chromosomes./ G. Dejong, A.H. Telenius, H. Telenius, C.F. Perez, J.I. Drayer, G. Hadlaczky // *Cytometry.* 1999. - № 35 - P.129–133.
92. Qin, J.Y. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter./ J.Y. Qin, L. Zhang, K.L. Clift, I. Hular, A.P. Xiang, B.-Z. Ren, B.T. Lahn // *PLoS One.* 2010. - № 5 - P.10611.

93. Soriano, P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain./ Soriano P.// Nat. Genet. 1999. - № 21 - P.70–71.
94. Blaas, L. Bacterial artificial chromosomes improve recombinant protein production in mammalian cells./ L. Blaas, M. Musteanu, R. Eferl, A. Bauer, E. Casanova // BMC Biotechnol. 2009. - № 9 - P.3.
95. Eszterhas, S.K. Transcriptional interference by independently regulated genes occurs in any relative arrangement of the genes and is influenced by chromosomal integration position./ S.K. Eszterhas, E.E. Bouhassira, D.I.K. Martin, S. Fiering // Mol. Cell. Biol. 2002. - № 22 - P.469–479.
96. Mader A., Prewein B., Zboray K., Casanova E., Kunert R. Exploration of BAC versus plasmid expression vectors in recombinant CHO cells. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. - № 97 - P.4049–4054.
97. Wirth, M. Isolation of overproducing recombinant mammalian cell lines by a fast and simple selection procedure./ M. Wirth, J. Bode, G. Zettlmeissl, H. Hauser // Gene. 1988. - № 73 - P.419–426.
98. Chusainow J., Yang Y.S., Yeo J.H.M., Toh P.C., Asvadi P., Wong N.S.C., Yap M.G.S. A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: what makes a stable high producer. / J. Chusainow, Y.S. Yang, J.H.M. Yeo, P.C. Toh, P. Asvadi, et al. // Biotechnol. Bioeng. 2009. - № 102 - P.1182–1196.
99. Schlatter, S. On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells./ S. Schlatter, S. Stansfield, D. Dinnis, A. Racher, J. Birch, D. James // Biotechnol. Prog. 2005. - № 21 - P.122–133.
100. Dreesen, I.A.J. Ectopic expression of human mTOR increases viability, robustness, cell size, proliferation, and antibody production of chinese hamster ovary cells. / I.A.J. Dreesen, M. Fussenegger // Biotechnol. Bioeng. 2011. - № 108 - P.853–866.
101. Ku, S.C.Y. Effects of overexpression of X-box binding protein 1 on recombinant protein production in Chinese hamster ovary and NS0 myeloma cells./ S.C.Y. Ku, D.T.W. Ng, M.G.S. Yap, S.-H. Chao // Biotechnol. Bioeng. 2008. - № 99 - P.155–164.
102. Wirth, D. Road to precision: Recombinase-based targeting technologies for genome engineering./ D. Wirth, L. Gama-Norton, P. Riemer, U. Sandhu, R. Schucht, H. Hauser // Curr. Opin. Biotechnol. 2007. - № 18 - P.411–419.
103. Cong, L. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems./ L. Cong, F.A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, et al. // Science. 2013. - № 339 - P.819–123.
104. Crawford, Y. Fast identification of reliable hosts for targeted cell line development from a limited-genome screening using combined ϕ C31 integrase and CRE-Lox technologies./ Y. Crawford, M. Zhou, Z. Hu, J. Joly, B. Snedecor, A. Shen, A. Gao // Biotechnol. Prog. 2013. - № 29 - P.1307–1315.

105. Xu, X. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary [CHO]-K1 cell line./ X. Xu, H. Nagarajan, N.E. Lewis, S. Pan, Z. Cai, X. Liu, W. Chen, M. Xie, W. Wang, et al.// *Nat. Biotechnol.* 2011. - № 29 - P.735–741.
106. Melville, M. Development and characterization of a Chinese hamster ovary cell-specific oligonucleotide microarray./ M. Melville, P. Doolan, W. Mounts, N. Barron, L. Hann, M. Leonard, M. Clynes, T. Charlebois // *Biotechnol. Lett.* 2011. - № 33 - P.1773–1779.
107. Wlaschin, K.F. EST sequencing for gene discovery in Chinese hamster ovary cells./ K.F. Wlaschin, P.M. Nissom, L. Gatti Mde, P.F. Ong, et al.// *Biotechnol. Bioeng.* 2005. - № 91 - P.592–606.
108. Baik, J.Y. Initial transcriptome and proteome analyses of low culture temperature-induced expression in CHO cells producing erythropoietin./ J.Y. Baik, M.S. Lee, S.R. An, S.K. Yoon, et al. // *Biotechnol. Bioeng.* 2006. - № 93 - P.361–371.
109. De Leon Gatti, M. Comparative transcriptional analysis of mouse hybridoma and recombinant Chinese hamster ovary cells undergoing butyrate treatment./ M. De Leon Gatti, K.F. Wlaschin, P.M. Nissom, M. Yap, W.S. Hu // *J. Biosci. Bioeng.* 2007. – № 103 - P.82–91.
110. Baycin-Hizal, D. Proteomic analysis of Chinese hamster ovary cells./ D. Baycin-Hizal, D.L. Tabb, R. Chaerkady R., L. Chen, et al.// *J. Proteome Res.* 2012. - № 11 - P.5265–5276.
111. Selvarasu, S. Combined in silico modeling and metabolomics analysis to characterize fed-batch CHO cell culture./ S. Selvarasu, S. Ho, W.P. Chong, N. S. Wong, et al. // *Biotechnol. Bioeng.* 2012. - № 109 - P.1415–1429.
112. Chong, W.P. Metabolomics profiling of extracellular metabolites in recombinant Chinese Hamster Ovary fed-batch culture./ W.P. Chong, L.T. Goh, S.G. Reddy, F.N. Yusufi, et al. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009. - № 23 - P.3763–3771.
113. Dietmair, S. Metabolite profiling of CHO cells with different growth characteristics./ S. Dietmair, M.P. Hodson, L.E. Quek, N.E. Timmins, P. Chrysanthopoulos, S.S Jacob, P. Gray, L.K. Nielsen // *Biotechnol. Bioeng.* 2012. - № 109 - P.1404–1414.
114. Hackl, M. Computational identification of microRNA gene loci and precursor microRNA sequences in CHO cell lines./ M. Hackl, V. Jadhav, T. Jakobi, O Rupp, K. Brinkrolf, A. Goesmann, A. Puhler, T. Noll, N. Borth, J. Grillari // *J. Biotechnol.* 2012. - № 158 - P.151–155
115. Hammond, S. Profiling conserved microRNA expression in recombinant CHO cell lines using Illumina sequencing./ S. Hammond, J.C. Swanberg, S.W. Polson, K.H. Lee // *Biotechnol. Bioeng.* 2012. - № 109 - P.1371–1375.
116. Barron, N. Engineering CHO cell growth and recombinant protein productivity by over-expression of miR-7./ N. Barron, N. Kumar, N. Sanchez, P. Doolan, C. Clarke, P. Meleady, F. O’Sullivan, M. Clynes// *J. Biotechnol.* 2011. - № 151 - P.204–211.

117. Jadhav, V. A screening method to assess biological effects of microRNA overexpression in Chinese hamster ovary cells./ V. Jadhav, M. Hackl, J.A. Bort, M Wieser, E. Harreither, R. Kunert, N. Borth, J. Grillari // *Biotechnol. Bioeng.* 2012. - № 109 - P.1376–1385.
118. Hackl, M. Next-generation sequencing of the Chinese hamster ovary microRNA transcriptome: Identification, annotation and profiling of microRNAs as targets for cellular engineering./ M. Hackl, T. Jakobi, J. Blom, D. Doppmeier, K. Brinkrolf, R. Szczepanowski, S.H. Bernhart, C. Honer Zu Siederdisen, J.A. Bort, M. Wieser, et al.// *J. Biotechnol.* 2011. - № 153 - P.62–75
119. Muller, D. MicroRNAs as targets for engineering of CHO cell factories./ D. Muller, H. Katinger, J. Grillari // *Trends Biotechnol.* 2008. - № 26 - P.359–365.
- 120 Little, P. Small and perfectly formed. /P. Little // *Nature.* 1993. - № 366 - P.204–205.
121. Branda, C.S. Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice./ C.S. Branda, S.M. Dymecki // *Dev. Cell.* 2004. - № 6 - P.7–28.
122. Golic, M.M. FLP-mediated DNA mobilization to specific target sites in *Drosophila* chromosomes. / M.M. Golic, Y.S. Rong, R.B. Petersen, S.L. Lindquist, K.G. Golic // *Nucleic Acids Res.* 1997. - № 25 - P.3665-3671.
123. Voziyanov, Y. A general model for site-specific recombination by the integrase family recombinases./ Y. Voziyanov, S. Pathania, M. Jayaram // *Nucleic Acids Res.* 1999. - № 27 - P.930-941.
124. O’Gorman, S. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells./ S. O’Gorman, D.T. Fox, G.M. Wahl // *Science.* 1991. - № 251 - P.1351–1355.
125. Voziyanov, Y. Stepwise manipulation of DNA specificity in F1p recombinase: Progressively adapting F1p to individual and combinatorial mutations in its target site./ Y. Voziyanov., J.H. Konieczka, A.F. Stewart., M. Jayaram // *J. Mol. Biol.* 2003. - № 326 - P.65–76.
126. Kito, M. Construction of engineered CHO strains for high-level production of recombinant proteins./ M. Kito, S. Itami, Y. Fukano, K. Yamana, T. Shibui // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. - № 60 - P.442–448.
127. Kameyama, Y. An accumulative site-specific gene integration system using Cre recombinase-mediated cassette exchange./ Y. Kameyama, Y. Kawabe, A. Ito, M. Kamihira // *Biotechnol. Bioeng.* 2010. - № 105 - P.1106–1114
128. Smith, M.C. Diversity in the serine recombinases./ M.C. Smith, H.M. Thorpe// *Mol. Microbiol.* 2002. - № 44 - P.299–307.
129. Pilbrough, W. Intracloal protein expression heterogeneity in recombinant CHO cells./ W. Pilbrough, T.P. Munro, P. Gray// *PLoS One.* 2009. - № 4 - P.8432.

130. Russell, J.P. Phage Bxb1 integrase mediates highly efficient site-specific recombination in mammalian cells. / J.P. Russell, D.W. Chang, A. Tretiakova, M. Padidam // *Biotechniques*. 2006. - № 40 - P.460 - 464.
131. Orfao, A. General concepts about cell sorting techniques. / A. Orfao, A. Ruiz-Arguelles // *Clin Biochem* 1996. - № 29 - P.5–9.
132. Corry W.D. Evaluation of density gradient separation methods. / W.D. Corry, P.A. Bresnahan, G.V.F. Seaman // *J Biochem Biophys Methods*. 1982. - № 7 - P.71–82.
133. Cramer, R. A simple and rapid method for isolation of eosinophilic granulocytes from human blood. / R. Cramer, P. Dri, G. Zabucchi, P. Patriarca // *J Leukoc Biol* 1992. - № 52 - P.331–336.
134. Gutierrez, C. Purification of human T and B cells by a discontinuous density gradient of percoll. / C. Gutierrez, R.R. Bernabe, J. Vega, M. Kreisler // *J Immunol Methods*. 1979. - № 29 - P.57–63.
135. Holmes, K.L. Characterization of aerosols produced by cell sorters and evaluation of containment. / K.L. Holmes // *Cytometry A*. 2011. - № 79 - P.1000–1008.
136. Islam, M.Z. Rapid and cheap prototyping of a microfluidic cell sorter. / M.Z. Islam, J.N. McMullin, Y.Y. Tsui // *Cytometry A*. 2011. - № 79 - P.361–367.
137. Bonner, W.A. Fluorescence activated cell sorting. / W.A. Bonner, H.R. Hulett, R.G. Sweet, L.A. Herzenberg // *Rev Sci Instrum*. 1972. - № 43 - P.404–409.
138. Hulett, H.R. Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. / H.R. Hulett, W.A. Bonner, J. Barrett, L.A. Herzenberg // *Science*. 1969. - № 166 - P.747–749.
139. Miltenyi, S. High gradient magnetic cell separation with MACS. / S. Miltenyi, W. Müller, W. Weichel, A. Radbruch // *Cytometry*. 1990. - № 11 - P.231–238.
140. Grützkau A, Radbruch A. Small but mighty: how the MACS-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years. / A. Grützkau, A. Radbruch // *Cytometry A*. 2010. – № 77 – P. 643–647.
141. Coquery, C.M. Optimized protocol for the isolation of spleen-resident murine neutrophils. / C.M. Coquery, W. Loo, M. Buszko, J. Lannigan, L.D. Erickson // *Cytometry A*. 2012. – № 81 – P. 806-814.
142. Kolmsee, T. Rare codons play a positive role in the expression of the stationary phase sigma factor RpoS [σ^S] in *Escherichia coli*. / T. Kolmsee, R. Hengge // *RNA Biol*. 2011. – P. 8
143. Tegel, H. Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta[DE3] / H. Tegel, S. Tourle, J. Ottosson, A. Persson // *Protein expression and purification*. 2010. – № 69– P. 159–167.

144. Campbell, M. Utilization of site-specific recombination for generating therapeutic protein producing cell lines./ M. Campbell, S. Corisdeo, C. McGee, D. Kraichely// Mol. Biotechnol. 2010. – № 45 – P. 199–202.
145. Zdanovsky, A.G. Simple and efficient method for heterologous expression of clostridial proteins./ A.G. Zdanovsky, M.V. Zdanovskaia// Appl Environ Microbiol. 2000. – № 66– P. 3166–3173.
146. Urlaub, G. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity./ G. Urlaub, L.A. Chasin// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. – № 77 – P. 4216–4220.
147. Liu, P.Q. Generation of a triple-gene knockout mammalian cell line using engineered zinc-finger nucleases./ P.Q. Liu, E.M. Chan, G.J. Cost, L. Zhang, J. Wang, J.C. Miller, D.Y. Guschin, A. Reik, M.C. Holmes, J.E. Mott, et al.// Biotechnol. Bioeng. 2010. – №106 – P. 97–105
148. Lonza launches next generation GS gene expression system. [(Accessed on 15 February 2013)]. Available online: <http://www.lonza.com/about-lonza/media-center/news/2012/120710-GS-System-e.aspx>.
149. Sautter, K. Selection of high-producing CHO cells using NPT selection marker with reduced enzyme activity./ Sautter K., Enenkel B.// Biotechnol. Bioeng. 2005. – №89 – P. 530–538.
150. Westwood, A.D. Improved recombinant protein yield using a codon deoptimized DHFR selectable marker in a CHEF1 expression plasmid./ Westwood A.D., Rowe D.A., Clarke H.R.// Biotechnol. Prog. 2010. - №26 – P. 1558–1566.
151. Peng, R.W. Differential effect of exocytic SNAREs on the production of recombinant proteins in mammalian cells. / R.W. Peng, E. Abellan, M. Fussenegger //Biotechnol. Bioeng. 2011. – №108 – P.611–620.
152. Datta, P. An 'omics approach towards CHO cell engineering. / P. Datta, R.J. Linhardt, Sharfstein S.T. //Biotechnol. Bioeng. 2013. – №110 – P.1255–1271.
153. Mohan, C. Assessment of cell engineering strategies for improved therapeutic protein production in CHO cells. / C. Mohan, Y.G. Kim, J. Koo, G.M. Lee//Biotechnol. J. 2008. – №3 – P.624–630.
154. Shaffer, A.L. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation./ Shaffer A.L., Shapiro-Shelef M., Iwakoshi N.N., Lee A.H., Qian S.B., Zhao H., Yu X., Yang L., Tan B.K., Rosenwald A., et al.// Immunity. 2004. – №21 – P.81–93.
155. Miller, J.C. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing./ Miller J.C., Tan S., Qiao G., Barlow K.A., Wang J., Xia D.F., Meng X., Paschon D.E., Leung E., Hinkley S.J., et al.// Nat. Biotechnol. 2011. – №29 – P.143–148

156. Miller, J.C. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing./ Miller J.C., Holmes M.C., Wang J., Guschin D.Y., Lee Y.L., Rupniewski I., Beausejour C.M., Waite A.J., Wang N.S., Kim K.A., et al.// *Nat. Biotechnol.* 2007. – №25 – P.778–785.
157. Del Tito B.J., Effects of a minor isoleucyl tRNA on heterologous protein translation in *Escherichia coli*./ B.J. Del Tito, J.M. Ward, J. Hodgson, C.J. Gershater, H. Edwards, L.A. Wysocki, F.A. Watson, G. Sathe, J.F. Kane // *J Bacteriol.* 1995. – № 177 – P. 7086–7091.
158. Fan, L.Improving the efficiency of CHO cell line generation using glutamine synthetase gene knockout cells./ L. Fan, I. Kadura, L.E. Krebs, C.C. Hatfield, M.M. Shaw, C.C. Frye // *Biotechnol. Bioeng.* 2012. – № 109 – P. 1007–1015.
159. Podda, S. Transfer and expression of the human multiple drug resistance gene into live mice. / S. Podda, M. Ward, A. Himelstein, C. Richardson, E. de la Flor-Weiss, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992. - № 89 – P. 9676-9680.
160. Bagnis, C. Hematological reconstitution and gene therapy: retroviral transfer of the bacterial beta-galactosidase activity into human hematopoietic CD34+ cell populations and into T lymphocytes derived from the peripheral blood./ C. Bagnis, A.M. Imbert, G. Gravis, D. Herrera, C. Pavon, et al. // *Leukemia.* 1995. – № 9 (Suppl 1) – P. S61–63.
161. Yu, L. Whole blood leukocytes isolation with microfabricated filter for cell analysis./ L.Yu, P. Warner, B. Warner, D. Recktenwald, D. Yamanishi et al.,// *Cytometry A.* 2011. – № 79 – P. 1009–1015.
162. Beausejour, C.M. Selection of drug-resistant transduced cells with cytosine nucleoside analogs using the human cytidine deaminase gene./ C.M. Beausejour, N. Eliopoulos, L. Momparler, N.L. Le, R.L. Momparler.// *Cancer Gene Ther.* 2001. – № 8 – P. 669–676
163. Sorrentino, B.P. Selection of drug-resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1. / Sorrentino BP, Brandt SJ, Bodine D, Gottesman M, Pastan I, et al. // *Science.* 1992. – № 257 – P. 99–103
164. Hammill, L. The gel microdrop secretion assay: Identification of a low productivity subpopulation arising during the production of human antibody in CHO cells./ L. Hammill, J. Welles, G.R. Carson // *Cytotechnology.* 2000. – № 34 – P. 27–37.
165. Kawahara, M. AMEGA: antigen-mediated genetically modified cell amplification./ M. Kawahara, H. Ueda, K. Tsumoto, I. Kumagai, Nagamune T. // *J Immunol Methods.* 2004. – № 284 – P. 187–194
166. Beckett, D. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. / D. Beckett, E. Kovaleva, P.J. Schatz. // *Protein Sci.* 1999. – № 8 – P. 921–929
167. Davies, S.L. Functional heterogeneity and heritability in CHO cell populations./ S.L. Davies, C.S. Lovelady, R.K. Grainger, A.J. Racher, R.J. Young, D.C. James // *Biotechnol. Bioeng.* 2013. – № 110 – P. 260–274.

168. Derouazi, M. Genetic characterization of CHO production host DG44 and derivative recombinant cell lines./ M. Derouazi, D. Martinet, N. Besuchet Schmutz, R. Flaction, M. Wicht, M. Bertschinger, D.L. Hacker, J.S. Beckmann, F.M. Wurm // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. – № 340 – P. 1069–1077.
169. Angov, E. Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host./ E. Angov, C.J. Hillier, R.L. Kincaid, J.A. Lyon.// *PLoS ONE*. 2008. – № 3 – P. e2189.
170. Kawahara, M. Antigen-mediated growth control of hybridoma cells via a human artificial chromosome./ M. Kawahara, T. Inoue, X. Ren, T. Sogo, H. Yamada, et al. // *Biochim Biophys Acta*. 2007. – № 1770 – P. 206–212
171. Kawahara, M. Selection of genetically modified cell population using hapten-specific antibody receptor chimera. / M. Kawahara, H. Kimura, H. Ueda, T. Nagamune // *Biochem Biophys Res Commun.* 2004. – № 315 – P. 132–138
172. Kawahara, M. Bypassing antibiotic selection: positive screening of genetically modified cells with an antigen-dependent proliferation switch./ M. Kawahara, H. Ueda, S. Morita, K. Tsumoto, I. Kumagai, et al. // *Nucleic Acids Res.* 2003. – № 31 – P. 32
173. Yang G., Withers S.G. Ultrahigh-throughput FACS-based screening for directed enzyme evolution./ G. Yang, S.G. Withers // *Chembiochem.* 2009. – № 10 – P. 2704–2715.
174. Black, C.B. Cell-based screening using high-throughput flow cytometry./ C.B. Black., T. Duensing, L.S. Trinkle, R.T. Dunlay // *Assay Drug Dev. Technol.* 2011. – № 9 – P. 13–20.
175. Meng Y.G., Green fluorescent protein as a second selectable marker for selection of high producing clones from transfected CHO cells./ Y.G. Meng, J. Liang, W.L. Wong, V. Chisholm // *Gene*. 2000. – № 242 – P. 201–207.
176. Yoshikawa T., Flow cytometry: An improved method for the selection of highly productive gene-amplified CHO cells using flow cytometry./ T. Yoshikawa, F. Nakanishi, Y. Ogura, D. Oi, T. Omasa, Y. Katakura, M. Kishimoto, K.I. Suga // *Biotechnol. Bioeng.* 2001. – № 74 – P. 435–442.
177. Dharshanan, S. Rapid automated selection of mammalian cell line secreting high level of humanized monoclonal antibody using Clone Pix FL system and the correlation between exterior median intensity and antibody productivity./ S. Dharshanan, H. Chong, C.S. Hung, Z. Zamrod, N. Kamal // *Electron. J. Biotechnol.* 2011. – P. 14
178. Dainiak, M.B., Methods in cell separations./ M.B. Dainiak, A. Kumar, I.Y. Galaev, B. Mattiasson // *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007. – № 106 – P. 1–18.
179. Chalmers, J.J., Flow Through, Immunomagnetic Cell Separation./ J.J. Chalmers, M. Zborowski, L. Sun, L. Moore // *Biotechnol Prog.* 1998. – Vol. 14. – P. 141–148.

180. Nesbeth, D., Metabolic biotinylation of lentiviral pseudotypes for scalable paramagnetic microparticle-dependent manipulation. / D. Nesbeth, S.L. Williams, L. Chan, T. Brain, N.K. Slater, et al. // *Mol Ther.* 2006. – № 13 – P. 814–822