

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК»
ИНСТИТУТ БИОИНЖЕНЕРИИ

На правах рукописи

Воробьев Иван Иванович

МЕТОДЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ГЛИКОПРОТЕИНЫ

03.01.04 - Биохимия

диссертация на соискание ученой степени

доктора биологических наук

научный консультант

доктор биологических наук, профессор, академик

Скрябин Константин Георгиевич

Москва - 2019

Оглавление

1.	ВВЕДЕНИЕ.....	7
2.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
2.1.	Системы гетерологической экспрессии белков в клетках млекопитающих с высоким выходом	17
2.1.1.	Промышленно пригодные методы культивирования клеток млекопитающих	25
2.2.	Фактор VII свертывания крови	26
2.3.	Фактор VIII свертывания крови.....	27
2.3.1.	Полноразмерный рекомбинантный фVIII.....	28
2.3.2.	Рекомбинантный фVIII с делецией В-домена	30
2.3.3.	Лекарственные препараты фVIII пролонгированного действия	34
2.3.4.	Факторы, ограничивающие продуктивность систем гетерологической экспрессии фVIII	35
2.4.	Фактор IX свертывания крови человека.....	37
2.4.1.	Заместительная терапия гемофилии В	38
2.4.2.	Рекомбинантный фIX.....	39
2.4.3.	Структура и пост-трансляционные модификации фIX	40
2.4.4.	Улучшения процессов получения рекомбинантного фIX.....	44
2.4.5.	Возможности и ограничения методов получения фIX в трансгенных организмах.....	45
2.4.6.	Измененные варианты рекомбинантного фIX для клинического применения.....	48
2.4.7.	Потенциал и границы возможностей генотерапии гемофилии В.....	51
2.4.8.	Возможные пути повышения продуктивности систем экспрессии фIX в клетках CHO ..	56
2.5.	Фолликулостимулирующий гормон человека.....	59
2.5.1.	Биосинтез, секреция и транспорт ФСГ	60
2.5.2.	Роль олигосахаридных групп в функционировании ФСГ.....	61
2.5.3.	Рецептор ФСГ, общая схема передачи сигнала.....	63
2.5.4.	Биологические функции ФСГ	63
2.5.5.	Рекомбинантный ФСГ для клинического применения.....	65
2.5.6.	Продуктивность существующих систем биосинтеза ФСГ и возможности по ее увеличению	66
2.6.	Лютеинизирующий гормон человека.....	69
2.7.	Конъюгаты полипептидов с полисиаловой кислотой как искусственные гликопротеиды.....	72

2.7.1. Способы химической модификации инсулина.....	74
2.7.2. Оксинтомодулин.....	75
3. Материалы и методы.....	77
3.1. Методы работы с ДНК.....	77
3.1.1. Общие методы работы с ДНК.....	77
3.1.2. Создание экспрессионных конструкций.....	82
3.1.3. Препаративное получение плазмид для трансфекции.....	91
3.2. Методы работы с бактериями <i>Escherichia coli</i>	91
3.3. Методы работы с культурами клеток млекопитающих.....	92
3.3.1. Трансфекция и культивирование транзистентно трансфицированных клеток.....	93
3.3.2. Получение стабильно трансфицированных клеток.....	94
3.3.3. Создание моноклональных линий-продуцентов.....	94
3.3.4. Клонирование методом предельных разведений.....	95
3.3.5. Получение клональных продуцентов фIX.....	95
3.3.6. Получение стабильно трансфицированных популяций клеток при использовании пар векторов с маркерами устойчивости DHFR и GS.....	96
3.4. Методы анализа продуцентов.....	96
3.4.1. Выделение геномной ДНК.....	96
3.4.2. Выделение РНК и получение кДНК.....	97
3.4.3. ПЦР в реальном времени.....	97
3.4.4. Саузерн-блот гибридизация.....	100
3.4.5. Иммуноферментный анализ.....	100
3.4.6. Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ).....	101
3.4.7. Количественное определение белка.....	102
3.4.8. Иммуноблоттинг.....	102
3.4.9. Изоэлектрическое фокусирование.....	103
3.4.10. Коагулометрия.....	104
3.4.11. Ферментативная кинетика.....	104
3.4.12. Измерение концентрации флуоресцентных белков и проточная цитофлуориметрия.....	104
3.4.13. Модификации состава культуральной среды при культивировании линии-продуцента фVIII.....	105
3.5. Очистка и характеристика продуктов.....	106
3.5.1. Хроматографическая очистка фVIII.....	106
3.5.2. Выделение и очистка фIX.....	108

3.5.3	Хроматографическая очистка ФСГ	108
3.5.4.	Формулирование ФСГ-содержащего препарата	109
3.5.5.	Определение примеси ДНК штамма-продуцента в очищенном препарате ФСГ	110
3.5.6.	Определение родственных примесей (окисленных форм) в препарате ФСГ.....	111
3.5.7.	Трипсинолиз ФСГ	111
3.5.8.	Анализ сахаров	112
3.5.9.	Резорциноловый метод определения сиаловой кислоты.....	112
3.5.10.	Масс-спектрометрия	112
3.6.	Получение мкАт	113
3.6.1.	Получение мкАт к фVII	113
3.6.2.	Получение мкАт к фVIII.....	118
3.7.	Компьютерное моделирование	119
3.8.	Методы анализа ФСГ в фармацевтических композициях.	120
3.9.	Методы физико-химического анализа субстанции ФСГ	121
3.9.1	Определение первичной последовательности.....	121
3.9.2.	Изучение вторичной и третичной структуры.....	123
3.9.3.	Определение состава N-гликанов	123
3.9.4.	Определение биологической активности <i>in vitro</i>	124
3.10.	Методы исследования ФСГ <i>in vivo</i>	125
3.10.1.	Определение биологической активности <i>in vivo</i>	125
3.10.2.	Острая токсичность.....	125
3.10.3.	Подострая токсичность.....	126
3.11.	Методы проведения клинического исследования ФСГ	127
3.12.	Получение конъюгата инсулина и полисиаловой кислоты.....	128
3.13.	Получение конъюгата оксинтомодулина с полисиаловой кислотой	129
3.13.1.	Синтез конъюгата ОХМ с полисиаловой кислотой	130
3.13.2.	Получение очищенного конъюгата	130
3.13.3.	Химическое десиалирование PSA-OXM.....	131
3.13.4.	Пептидное картирование при помощи протеазы Asp-N.....	131
3.13.5.	Ограниченный протеолиз при помощи протеазы DPP-IV	132
3.13.6.	Определение активности PSA-OXM на животной модели	132
4.	Результаты исследования.....	133
4.1.	Создание линии клеток-продуцентов фактора VII в клетках линии ВНК при помощи стандартной векторной плазмиды	133

4.2. Создание линии продуцента фактора VIII с делецией В-домена на базе стандартной экспрессионной системы в клетках линии CHO	138
3.2.1. Создание экспрессионных конструкций делеционного мутанта фVIII	139
4.2.2. Получение и характеристика линии-продуцента BDD-фVIII	139
4.2.3. Получение мкАт для препаративной очистки фVIII	141
4.3. Дизайн генетических элементов для оригинальной системы экспрессии p.1.1	143
4.3.1. Получение минимального базового вектора pBL	143
4.3.2. Получение фланкирующих областей гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка	144
4.3.3. Получение экспрессионного вектора p.1.1	146
4.3.4. Проверка свойств вектора p1.1 для модельного белка eGFP	147
4.3.5. Получение совместимых с p1.1 экспрессионных векторов серии p1.2	150
4.4. Получение и характеристика линий-продуцентов BDD-фVIII на основе разработанной системы экспрессии	156
4.4.1. Изменение условий культивирования для увеличения концентрации фVIII в среде..	161
4.4.2. Очистка и характеристика BDD-фVIII	165
4.4.3. Компьютерное моделирование, поиск синтетического лиганда для очистки фVIII ...	167
4.5. Ко-экспрессия гена целевого белка и вспомогательных генов на примере фактора свертывания крови IX	169
4.5.1. Получение и характеристика первичных линий-продуцентов фIX	169
4.5.2. Ко-экспрессия генов PACE/furin и VKORC1	171
4.5.3. Характеристика линии клеток 3B12-86	173
4.5.4. Выделение и очистка фIX	175
4.6. Ко-экспрессия пары генов, образующих гетеродимерный гликопротеин, при помощи трицистронного вектора, на примере ФСГ	176
4.6.1. Получение и характеристика клональных линий-продуцентов ФСГ	180
4.6.2. Получение очищенного ФСГ, пригодного для клинического применения	183
4.6.3. Характеристика очищенного ФСГ	184
4.6.4. Фармацевтическая композиция прототипа лекарственного средства ФСГ	192
4.6.5. Доклинические исследования субстанции ФСГ	193
4.6.6. Клиническое исследование лекарственного препарата ФСГ	195
4.7. Одновременная амплификация пары экспрессионных плазмид в геноме клеток-продуцентов. Получение продуцентов лютеинизирующего гормона	198

4.7.1. Возможность ко-амплификации пары плазмид на примере модельных флуоресцентных белков	198
4.7.2. Многостадийная ко-амплификация пары плазмид на примере лютеинизирующего гормона человека.....	200
4.8. Создание искусственных гликопротеидов методом химической конъюгации с полисиаловой кислотой	204
4.8.1. Получение чистого препарата конъюгата инсулина и полисиаловой кислоты	204
4.8.2. Конъюгат оксинтомодулина и полисиаловой кислоты	207
4.8.3. Определение точки конъюгации при помощи пептидного картирования.....	209
4.8.4. Определение чувствительности к DPP-IV	212
4.8.5. Влияние PSA-ОХМ на общее потребление пищи в краткосрочном тесте	212
4.9. Механизм взаимодействия каталитических антител с фосфоорганическими субстратами	215
5. Обсуждение результатов	220
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	232
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	235
8. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	263

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Актуальность проблемы

Одной из важнейших проблем современной биохимической науки является разработка платформы получения функционально активных рекомбинантных белков. Установление структурных особенностей генетических конструкций, обеспечивающих механизмы экспрессии генов, а также пути направленной оптимизации элементов этих конструкций находится на пике современной биохимии и тесно связано с нуждами биотехнологии.

Одной из центральных биотехнологических задач, решаемых при создании оригинальных и воспроизведенных препаратов рекомбинантных белков для медицинского применения, является создание линий-продуцентов и штаммов-продуцентов, сочетающих максимальную продуктивность и достаточную генетическую стабильность при их последовательной культивации в течение нескольких месяцев. Получение фармацевтически значимых гликопротеинов в абсолютном большинстве случаев предполагает использование культивируемых клеток млекопитающих, в первую очередь клеток линии яичника китайского хомячка (СНО) и ее производных сублиний. В промышленной биофармацевтике для генетической трансформации клеток традиционно используются векторные плазмиды на основе немедленного раннего промотора цитомегаловируса CMV и данный подход имеет ряд существенных ограничений, связанных с ограниченной стабильностью функциональных генетических элементов вирусов в геноме культивируемых клеток. В ряде работ рассматриваются возможности замены вирусных промоторов на промоторы генов домашнего хозяйства человека или китайского хомячка, однако существующие решения в данной области обладают многими частными недостатками. Одним из лучших существующих решений в данной области можно считать использование полной некодирующей части гена фактора элонгации трансляции 1 альфа (EEF1A1) китайского хомячка в качестве вектора для генов целевых белков. Использование данных генетических элементов позволяет получать панели клональных линий-продуцентов со схожей и относительно высокой удельной продуктивностью, при этом как большинство таких клональных линий, так и исходные поликлональные популяции клеток как правило сохраняют свою удельную продуктивность в течение 2-3 месяцев культивирования в отсутствии селективного давления. Тем не менее, существовавшие к моменту начала настоящей работы плазмидные векторы на основе EEF1A1 китайского хомячка были малоприспособлены для практического использования из-за очень большого размера плазмиды,

крайне низкой эффективности инсерции генетической кассеты в геном клеток и, предположительно, слабого ответа на попытки их амплификации в геноме под действием возрастающих концентраций селекционного агента метотрексата (МТХ).

Следует отметить, что решение задач по получению клеточных линий-продуцентов рекомбинантных белков для медицинского применения подчиняется различной логике для инновационных лекарственных средств и их воспроизведенных аналогов (биодженериков, биоаналогов, биосимиляров). Клональные клеточные линии-продуценты белков для инновационных лекарственных средств должны быть получены за минимальное время и должны обеспечивать постоянство свойств целевого белка, то есть одинаковый уровень пост-трансляционных модификаций и сходство структур N- и O-связанных олигосахаридов при различных режимах культивации клеток. Вследствие этого, задачи по максимизации удельной и общей продуктивности клеток оказываются вторичными и многие линии-продуценты оригинальных рекомбинантных белков для медицинского применения обладают удельными продуктивностями, весьма далекими от физиологических возможностей клеток-продуцентов.

Одновременно с этим, при получении линий-продуцентов рекомбинантных белков для воспроизведенных лекарственных средств задачи максимизации удельной и общей продуктивности являются первичными. Секретируемый такими клеточными линиями целевой белок может быть сравнен с существующим «оригиналом» и при обнаружении существенных отличий кандидатная клеточная линия может быть отброшена либо могут быть изменены условия культивирования для восстановления биоэквивалентности воспроизведенного и оригинального белков.

Основной целью настоящей работы являлась разработка оптимальных генетических конструкций для экспрессии генов и методов получения клеточных линий, продуцирующих максимально возможные количества рекомбинантных гликопротеинов для последующего создания на их основе воспроизведенных лекарственных средств. Создание новых векторных плазмид для целей гетерологической экспрессии фармацевтически значимых белков имеет не только прикладное, но и некоторое фундаментальное значение. Получение линий клеток-продуцентов с существенно большим уровнем секреции биологически активных форм фармацевтически значимых белков является актуальной практической задачей, результаты решения которой будут востребованы современной биофармацевтикой и могут быть использованы для получения промышленных систем экспрессии терапевтических белков различных классов и антигенов для получения биотехнологических вакцин.

В данной работе разрабатываемые генетические конструкции и методы создания клональных клеточных линий были последовательно использованы для разработки промышленных технологий получения медицински значимых гликопротеидов, а именно факторов свертывания крови VIIa, VIII, IX, а также гликопротеидных гетеродимерных гормонов – фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ).

Все данные белки в настоящий момент широко используются в клинической практике, относятся к числу жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов в Российской Федерации и могут производиться (и в некоторых случаях уже производятся) как воспроизведенные лекарственные средства. Более подробное описание данных белков, их терапевтическое значение и особенности экспрессии их генов в гетерологических системах будут подробно рассмотрены в обзоре литературы.

Отдельной задачей для современной биохимии и биотехнологии можно считать создание искусственных гликопротеидов, заменяющих природные негликозилированные или слабо гликозилированные полипептиды в медицинской практике. Одним из возможных вариантов создания таких белков является химическая конъюгация интактных полипептидов с природным линейным полисахаридом – полисиаловой кислотой. Очевидным преимуществом таких модифицированных полипептидов (или белков) над их интактной формой является значительно большее время их полувыведения из системной циркуляции, что позволяет поддерживать их концентрацию в организме пациентов в относительно узком диапазоне при меньшем числе инъекций. Возможные варианты решения задачи получения таких конъюгатов были исследованы на примерах инсулина человека и полипептидного гормона окситомодулина, родственного глюкагону.

Искусственные гликопротеиды и, в частности, конъюгаты полипептидов с полисиаловой кислотой, также могут рассматриваться в довольно широком контексте создания биологических лекарственных средств пролонгированного действия и полученные в настоящей работе результаты могут быть использованы для разработки конъюгатов различных белков и полипептидов с полисиаловой кислотой для последующего клинического применения.

Отдельного интереса в области создания новых лекарственных средств заслуживают фрагменты моноклональных антител, ковалентно связывающие свои небелковые антигены, в частности фосфороорганические вещества. В настоящий момент ни одно из таких веществ не было допущено до клинического применения, однако уточнение механизмов их взаимодействия с антигенами (субстратами) позволит в будущем получить прототипы лекарственных средств-антидотов с надлежащей эффективностью действия.

Таким образом, в данной диссертационной работе решался комплекс задач, как чисто фундаментальных, так и прикладных. Основным направлением предпринятых исследований явилось разработка новых принципов создания векторов для экспрессии целевых белков в клетках млекопитающих. К проблемам фундаментального характера следует отнести также и оптимизацию способов химической модификации рекомбинантных препаратов, получаемых с целью разработки лекарственных средств пролонгированного действия. Значительное внимание уделено инновационным методам очистки биотехнологически важных препаратов. Учитывая специфику использования получаемых продуктов, особое внимание было уделено вопросу воспроизводимости полученных методик, требуемую для отработки экономически обоснованных способов получения препаратов для доклинических и клинических испытаний.

1.2. Цель и задача исследований

Основной целью работы была демонстрация возможности получения клональных клеточных линий, продуцирующих большие количества функциональных мономерных и гетеродимерных гликопротеидов, характеристика их основных свойств и оценка возможности их промышленного использования. Для выбранных медицински значимых полипептидов целью работы являлась разработка методов получения их инновационных полисиалированных форм, пригодных для дальнейших исследований биоактивности и безопасности *in vivo*.

Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Создать клональные клеточные линии-продуценты фактора свертывания крови VII человека (фVII) на основе линии клеток почки сирийского хомячка ВНК 21 и разработать промышленно пригодную технологию получения конечного продукта – фактора VII активированного.
2. Исследовать возможности создания клональных линий клеток-продуцентов фактора VIII на основе линии клеток яичника китайского хомячка и разработать соответствующую технологию получения и очистки целевого белка
3. Усовершенствовать существующие векторы, предназначенные для гетерологической экспрессии генов гликопротеидов в животных клетках для достижения большей продуктивности клеточных линий, секретирующих биологически активные целевые белки, на примере фактора VIII
4. Разработать подходы к созданию клеточных линий, ко-экспрессирующих целевой ген и несколько вспомогательных генов, на примере фактора IX, и создать технологию получения целевого белка, пригодного для доклинических исследований.
5. Разработать способы сбалансированной экспрессии пары генов, кодирующих субъединицы целевого гетеродимерного белка, на примерах ФСГ и ЛГ.
6. Разработать промышленно пригодную технологию получения рекомбинантного ФСГ для доклинических и клинических исследований.
7. Разработать методы получения и очистки конъюгатов полипептидов и полисиаловой кислоты, позволяющие получить искусственные гликопротеиды для исследований *in vivo*, на примерах инсулина и окситоцидина человека.
8. Установить особенности механизма взаимодействия каталитических антител с фосфоорганическими субстратами.

1.3. Научная новизна и практическая значимость

На примере фактора VII было установлено, что промоторные области генов домашнего хозяйства млекопитающих, а именно коровый промотор гена EF1, могут быть применены для создания промышленно пригодных клеточных линий-продуцентов.

На примере фактора VIII было впервые обнаружено, что эффективность использования некодирующих участков гена EEF1A1 для создания линий-продуцентов гликопротеинов может быть резко увеличена при введении в состав векторной плазмиды фрагмента конкатемера длинного концевого повтора вируса Эпштейна-Барр (EBV-TR). Данный генетический элемент увеличивал эффективность интеграции генетических конструкций в геном клетки-хозяина на полтора порядка и не препятствовал последующей амплификации в геноме клеток интегрированных кассет под действием возрастающих концентраций метотрексата.

При помощи данного подхода были получены и исследованы клональные линии-продуценты фактора VIII. Было установлено, что общая продуктивность линий-продуцентов достигает 40 МЕ/мл культуры при простом периодическом культивировании, что существенно превосходит известные ранее показатели. На примере фактора IX свертывания крови человека было продемонстрировано, что векторные плазмиды, содержащие одинаковые некодирующие участки гена EEF1A1 и элемент EBV-TR, но различные селекционные маркеры, могут быть успешно интегрированы в геном клеток при последовательных раундах трансфекции и селекции. В клональных линиях-продуцентах фактора IX была успешно проведена ко-экспрессия двух вспомогательных генов – фурина человека и витамин-К-оксиредуктазы китайского хомячка, что позволило вести биосинтез практически полностью биологического активного фактора IX с конечной продуктивностью около 6 МЕ/мл культуры, что превосходит известный мировой уровень. Полученный при помощи созданной линии клеток препарат биоаналогового фактора IX успешно прошел доклинические испытания.

На примере гетеродимерного гликопротеина фолликулостимулирующего гормона человека (ФСГ) нами также было продемонстрировано, что разработанные векторные плазмиды позволяют вести координированную экспрессию двух различных генов при их соединении в полицистронную матрицу при помощи интактного внутреннего сайта связывания рибосом вируса энцефаломиокардита. Путем проведения трансфекции дополнительной генетической конструкции, кодирующей только одну цепь ФСГ, были созданы клональные продуценты, секретирующие преимущественно гетеродимер ФСГ и только небольшие количества свободной альфа-цепи данного гликопротеида при конечной

концентрации целевого белка около 80 мг/л культуры, что также значительно превосходит все ранее описанные системы биосинтеза ФСГ человека. Было впервые продемонстрировано, что при удельной продуктивности клеток-продуцентов более 10 пг/клетка/день, то есть на порядок более высоким, чем в других известных случаях, уровень терминального сиалирования N-гликанов в составе ФСГ остается достаточно высоким для выделения целевого белка с полной биологической активностью *in vivo*. Получаемый при помощи созданной клональной линии-продуцента биоаналоговый ФСГ успешно прошел доклинические и клинические испытания в РФ (фаза I и фаза III).

Для пары модельных флуоресцентных белков и гетеродимерного белка лютеинизирующего гормона человека (ЛГ) было установлено, что для векторов на основе некодирующих участков гена EEF1A1 возможна координированная амплификация в геноме клеток-продуцентов пары белков, связанных с генами различных селекционных маркеров, что позволяет более гибко управлять относительными уровнями экспрессии генов нескольких субъединиц целевых белков.

Был впервые получен конъюгат оксинтомодулина человека и полисиаловой кислоты, продемонстрировавший пролонгированный анорексигенный эффект в опытах *in vivo*. Было установлено, что для двух антител, ковалентно связывающих фосфоорганические соединения, механизм реакции может быть описан как индуцированное соответствие, рассчитаны кинетические параметры элементарных стадий процесса. Полученные результаты открывают перспективы дальнейшего совершенствования биокатализаторов на основе антител.

1.4. Личный вклад соискателя

Автор лично определял схемы генетических конструкций векторов семейства p1.1, проводил препаративное получение плазмидной ДНК для трансфекций, разрабатывал и рутинно применял методы определения концентрации секретируемых и внутриклеточных целевых белков для всех приведенных в работе объектов, проводил измерения копийностей и уровней экспрессии генов целевых белков в случае фактора свертывания крови IX. Автором лично были разработаны, отработаны и, в ряде случаев, масштабированы до промышленного размера все процессы очистки биофармацевтически значимых белков, секретируемых разработанными в ходе выполнения настоящей работы клеточными линиями.

Молекулярное клонирование, анализ продуцентов методами ПЦР и количественного ПЦР проводилось совместно с к.б.н. Н.А. Орловой. Процессы получения, очистки и анализа конъюгата инсулина и полисиаловой кислоты были разработаны и проведены лично

автором, процессы получения конъюгата оксинтомодулина и полисиаловой кислоты были разработаны и проведены совместно с к.б.н. В.А. Мацкевичом. Ведение клеточных культур, проведение трансфекций, клонирования методом предельных разведений, получения банков клеток проводилось совместно с С.В. Ковниром и к.б.н. Ю.А. Ходак.

Получение линий-продуцентов рекомбинантного фактора VII свертывания крови человека проводилось совместно с д.б.н. Н.А. Пономаренко, к.х.н. И. В. Смирновым, к.б.н. О.Г. Шамборант, к.б.н. Суриной Е.А.

Автором лично было проведено планирование экспериментов и интерпретация результатов для всех линий-продуцентов и обоих гликоконъюгатов, описанных в настоящей работе, за исключением продуцента фактора VII свертывания крови.

1.5. Апробация результатов работы

Основные научные результаты диссертационной работы были представлены на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (г. Новосибирск, 11 – 15 мая 2008 г.); Научно-практической конференции «Достижения в гематологии и трансфузиологии» (Москва, 17-18 ноября 2008 г.); III Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика» (Пушино, 10-15 октября 2010 г.); школе-конференции «Методы культивирования клеток» (Санкт-Петербург 6-10 октября 2008 г.); I Российском симпозиуме с международным участием «Биофарма-2009» (Турция, Анталия, 25-27 мая 2009 г.); Международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии» (Москва, 20-22 марта 2012 г.); 38-м Конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (FEBS) «Биологические механизмы» (Санкт-Петербург, 6-11 июля 2013 г.); V и VIII Московском международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 16-20 марта 2009 г. и 17-20 марта 2015 г.); V Съезде физиологов СНГ и V Съезде биохимиков России (Дагомыс, 4-9 октября 2016 г.); XXVII международной конференции Российской Ассоциации Репродукции Человека «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» (Санкт-Петербург, 6—9 сентября 2017 г.); на 16-ой, 19-ой, 20-ой, 23-ей Международных Пушинских школах-конференциях молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 16-21 апреля 2012 г., 20-24 апреля 2015 г., 18-22 апреля 2016 г., 15 – 19 апреля 2019 г.); на XXVI, XXVIII, XXIX, XXXI Зимних молодежных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 10-14 февраля 2014 г., 08-11 февраля 2016 г., 07-11 февраля 2017 г., 11-14 февраля 2019 г.).

1.6. Публикации

По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, из них 16 в журналах, рекомендованных ВАК РФ, материалов российских и международных конференций - 33. Оформлено 10 патентов РФ.

1.7. Объем и структура 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 305 ссылок. Диссертация изложена на 264 страницах машинописного текста и содержит 31 таблицу и 59 рисунков.

1.8. Положения, выносимые на защиту

2. Установлено, что векторная плаزمида p1.1, включающая некодирующие последовательности ДНК из области гена фактора элонгации трансляции 1 альфа (EEF1A1) китайского хомячка и фрагмент конкатемера длинного концевой повтора вируса Эпштейна-Барр (EBV-TR) интегрируется в геном клеток СНО с существенно повышенной вероятностью и позволяет эффективно экспрессировать гены целевых белков.
3. На примере линии клеток СНО, секретирующих делеционный вариант фактора VIII свертывания крови человека показано, что уровень секреции нестабильных гликопротеинов большого размера может быть многократно увеличен при использовании специализированного плазмидного вектора и многоступенчатой амплификации генетических кассет в геноме продуцентов.
4. На примере линии-продуцента фактора свертывания крови IX продемонстрировано, что разработанные плазмидные векторы могут быть применены для последовательных трансфекций целевого гена и вспомогательных генов.
5. Для случая фолликулостимулирующего гормона человека показано, что использование трицистронной матрицы, кодируемой плазмидой p1.1б в которой открытые рамки считывания двух субъединиц гетеродимерного целевого белка соединены при помощи внутреннего сайта связывания рибосом, позволяет получить линию-продуцент гликопротеина с исключительно высокой удельной продуктивностью и способностью секретировать преимущественно гетеродимерный целевой белок.

6. На примере лютеинизирующего гормона человека установлено, что разработанные векторные плазмиды позволяют вести ко-амплификацию пары целевых генов, один из которых связан с амплифицируемым маркером устойчивости, а второй – с неамплифицируемым маркером.
7. При помощи метода химической конъюгации полисиаловой кислоты и полипептидов получены чистые препараты гликоконъюгатов инсулина и оксинтомодулина, обладающие пролонгированной биологической активностью на животных моделях.
8. Каталитические антитела A5 и A17 образуют с фосфоорганическим веществом фосфонат X ковалентное соединение, при этом механизм реакции может быть описан как индуцированное соответствие.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Системы гетерологической экспрессии белков в клетках млекопитающих с высоким выходом

В настоящий момент больше трети всех рекомбинантных терапевтических белков производится в культивируемых клетках млекопитающих. Среди линий клеток млекопитающих, используемых в биофармацевтическом производстве, наиболее распространена линия клеток яичника китайского хомячка (*Cricetulus griseus*) СНО (Chinese hamster ovary) и ее производные (Рис. 1).

В клетках СНО в мире к 2016 году было получено около 75% всех белков, зарегистрированных в качестве лекарственных средств [1], в том числе половина из 10 наиболее продаваемых биологических «блокбастеров», то есть лекарственных средств, выручка от продажи которых превышает 1 млрд долларов США в год [2]. К 2006 году из 23 «блокбастеров» 8 производилось в бактериальной или дрожжевой системе экспрессии, а 15 - в клетках млекопитающих [3]. Таким образом, доля терапевтических белков, получаемых при помощи клеток СНО, существенно возросла за этот период, в том числе, за счет воспроизведенных лекарственных средств.

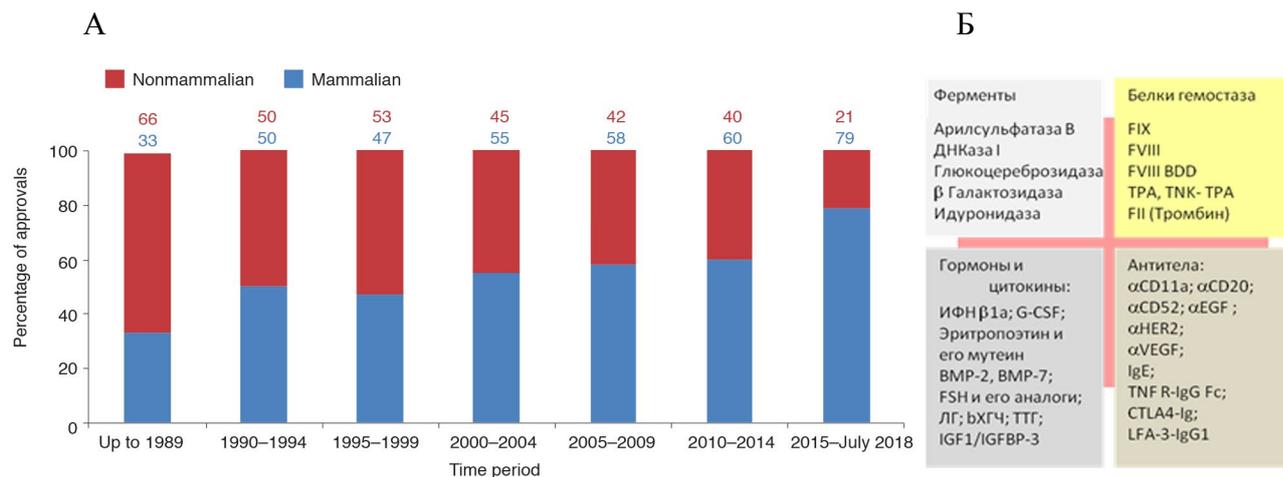


Рисунок 1. Клетки CHO как система экспрессии терапевтически значимых белков.

А - доля рекомбинантных белков, зарегистрированных в качестве лекарственных средств, получаемых в клетках млекопитающих, по годам, приведено из [1].

Б - примеры терапевтических белков разных классов, получаемых в клетках CHO по данным [4] и [3]. Обозначения: ДНКза I - Дезоксирибонуклеаза I, ИФН b1a - Интерферон b1a; G-CSF - Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; эритропоэтин и его мутеин - эритропоэтин и дарбепоэтин, BMP-2, BMP-7 - костные морфогенетические белки 2 и 7, FSH и его аналоги - Фолликулостимулирующий гормон и корифоллитропин, ЛГ - лютеинизирующий гормон, bXГЧ - Хорионический гонадотропин; ТТГ- Тиреотропный гормон; IGF1 - Инсулиноподобный фактор роста 1 с белком IGFBP-3; FIX, FVIII, FII - факторы свертывания крови IX, VIII и II соответственно; FVIII BDD – фактор VIII свертывания крови с делецией домена В, TPA – тканевый активатор плазминогена, TNK-TPA - его мутеин.

Наиболее важными параметрами промышленно используемых клеток животных – продуцентов фармацевтических белков принято считать их удельную продуктивность, т.е. количество целевого белка, секретируемое одной клеткой за сутки культивирования, сохранение данной удельной продуктивности в течение 60-90 дней последовательного культивирования на постоянном уровне, а также способность выбранного клона клеток к корректной пост-трансляционной модификации молекул целевого белка. В большинстве случаев как удельная продуктивность, так и эффективность работы систем пост-трансляционной модификации в выбранных клонах клеток имеет значительный разброс между клонами, однако при практических действиях по получению клеточных линий-продуцентов приоритетной целью считают нахождение небольшого числа клонов клеток с максимальной удельной продуктивностью, и уже среди них, при необходимости, отбирают клоны с тем или иным состоянием систем пост-трансляционной модификации белков. Наиболее изученные методы максимизации удельной продуктивности клеток-продуцентов приведены в Таблице 1. Можно также отметить, что культивируемые клетки животных, используемые в промышленном производстве субстанций лекарственных средств, должны обладать способностью делиться не реже, чем 1 раз за приблизительно 48 ч, что необходимо для поддержания экономически приемлемого соотношения времени стартового

экспоненциального роста культуры в биореакторе и времени ее продуктивного культивирования на высокой плотности клеток, в течение которого и происходит накопление основной массы целевого белка. В большинстве случаев, медленно делящиеся клоны клеток исчезают из рассмотрения исследователей еще на стадии первичного отбора продуктивных клонов, поскольку из-за малого числа клеток в колониях они не демонстрируют высокой общей концентрации продукта. Вследствие этого, основной целью при разработке новых линий-продуцентов биофармацевтически значимых белков можно считать повышение удельной продуктивности клеток.

Наиболее продуктивным методом повышения удельной продуктивности можно считать направленную амплификацию интегрированного в геном целевого гена и гена селекционного маркера, впервые описанную в работе Р. Кауфмана [5] для системы экспрессии гена тканевого активатора плазминогена и селекционного маркера дигидрофолатредуктазы (DHFR) мыши. В данной работе было установлено, что ко-трансфекция плазмид, кодирующих целевой белок и селекционный маркер DHFR под контролем вирусных промоторов SV40 приводит к появлению довольно большой доли стабильно трансфицированных клеток, отвечающих увеличением числа копий целевого гена на введение в культуральную среду специфического ингибитора DHFR - метотрексата (MTX).

Таблица 1. Способы повышения удельной продуктивности для линий клеток млекопитающих.

Область воздействия	Способы воздействия
Число копий целевого гена в геноме клеток-продуцентов	<ul style="list-style-type: none"> • Амплификация кассеты в геноме продуцентов • Увеличение сцепления селекционного маркера и целевого гена (IRES) • Гомологичная рекомбинация кассеты • Увеличение частоты интеграции
Транскрипционная активность копий гена	<ul style="list-style-type: none"> • Использование сильных промоторов • Направленная интеграция в активно транскрибируемые участки генома • Введение в генетическую кассету элементов, ремоделирующих хроматин
Стабильность мРНК целевого белка и уровень ее трансляции	<ul style="list-style-type: none"> • Кодон-оптимизация • Удаление криптических сайтов сплайсинга • Замена нетранслируемых областей гена
Эффективность транслокации и пост-трансляционного процессинга целевого белка	<ul style="list-style-type: none"> • Оверэкспрессия ферментов, производящих специфические пост-трансляционные модификации целевого белка • Генетический нокдаун сигнальных белков и шаперонов, препятствующих транслокации предшественника целевого белка
Метаболические свойства клеток-продуцентов	<ul style="list-style-type: none"> • Ограничение индукции апоптоза клеток-продуцентов путем оверэкспрессии или нокдауна сигнальных белков • Реинжиниринг основных метаболических путей клеток • Поиск и оверэкспрессия миРНК • Создание новых культивируемых линий клеток человека

Вследствие того, что собственные аллели гена *dhfr* в клетках CHO также могут отвечать геномной амплификацией на внесение в культеуральную среду возрастающих концентраций ингибитора DHFR метотрексата (MTX), использование DHFR в качестве селекционного маркера значительно более эффективно не в интактных клетках CHO, а в специально полученных производных клетках с генотипом *dhfr*⁻ и *dhfr*^{-/-}. Данные линии клеток были получены путем химического мутагенеза - сублиния CHO-DG44, не содержащая активных аллелей DHFR [6] [7], а также *dhfr*⁻ сублиния CHO DUKXB1. В настоящий момент такие линии клеток могут быть получены также путем направленного редактирования генома эндонуклеазами TALON или при помощи системы Crispr/CAS9.

В большинстве случаев уровень секреции клетками целевого белка определяется в основном уровнем мРНК целевого гена, а этот уровень, в свою очередь, определяется тремя факторами – силой промотора целевого гена, степенью эухроматинизации геномного локуса (или локусов), в который встроен целевой ген, а также числом копий целевого гена в геноме клетки.

Период времени, в течение которого должна сохраняться стабильность уровня экспрессии целевого гена при последовательном культивировании клеток, определяется необходимым числом их удвоений, которое было бы достаточно для получения маточного

клеточного банка, рабочего клеточного банка, проведения выращивания посевной культуры для инокуляции основного биореактора (или нескольких биореакторов) и непосредственно времени культивации клеток в основном биореакторе. В большинстве случаев все эти процессы могут быть уложены в 60-90 дней, или же 40-60 клеточных удвоений. В большинстве случаев биофармацевтического производства линия-продуцент должна культивироваться без добавления токсических агентов, к которым безусловно относятся антибиотики, МТХ и подобные им селекционные агенты. Вследствие этого, демонстрацию стабильности уровня секреции целевого белка также выполняют при помощи культуральной среды, не содержащей селекционных агентов.

Считается, что стабильность уровня экспрессии гена целевого белка при последовательных перeseвах линии-продуцента определяется устойчивостью промотора целевого гена к инактивации метилированием остатков цитидина [8], общей устойчивостью целевого гена и генетической кассеты к модификациям ДНК (делециям, инсерциям и точечным мутациям), а также общей интенсивностью процессов хромосомной транслокации в областях интеграции копий целевого гена [9]. Устойчивость промотора к инактивации метилированием определяется его последовательностью (промоторы клеток обычно устойчивее промоторов вирусов), устойчивость к модификации целевого гена и кассеты в целом коррелирует с ее длиной (чем короче ген и чем ближе селекционный маркер к целевому гену, тем менее вероятна его модификация), а вероятность делеции целевого гена при хромосомных транслокациях определяется положениями точек интеграции и может быть проверена только экспериментально. Поскольку процессы метилирования ДНК, возникновения мутаций и транслокации участков хромосом идут в культивируемых клетках непрерывно и практически не поддаются внешнему контролю, «среднюю» стабильность линий-продуцентов можно увеличивать уменьшением числа генераций клеток от момента их трансфекции до получения маточного клеточного банка (master cell bank, МСВ). Вместе с тем, можно предположить, что при продолжительном культивировании поликлональных популяций клеток в присутствии селекционных агентов до момента их финального клонирования могут быть элиминированы такие клоны клеток, в которых будут происходить быстрые процессы инактивации промотора целевого гена или гетерохроматинизации точки инсерции целевого гена. Основными аргументами против процессов длительной селекции-амплификации целевых генов в популяциях культивируемых клеток является увеличение вероятности возникновения мутаций в области открытой рамки считывания (ОРС) целевого белка и общий рост числа пассирований для родительских клеток. Поскольку для финальной клональной линии-продуцента всегда выполняется полное секвенирование области ОРС

целевого белка, время селекции и амплификации целевых генов может коррелировать только с долей клонов клеток-продуцентов, содержащих мутации в области ОРС целевого гена. Такие события на практике являются весьма редкими. Поскольку клетки линии СНО являются иммортализованными, число последовательных пассажей для них не ограничено явлениями старения клеток, однако можно предположить, что их генотип будет подвержен медленным изменениям при возникновении спонтанных мутаций, что может привести к потере функциональной активности тех или иных генов, кодирующих ферменты постр-трансляционного процессинга белков.

В целом, при создании промышленной линии-продуцента рекомбинантного белка должны быть одновременно решены 2 различные задачи – максимизация уровня мРНК целевого гена и ограничение числа последовательных пересевов трансфицированной культуры до определения конечного клона-продуцента и его масштабирования.

Для максимизации уровня мРНК целевого гена применяют три общих подхода:

- 1) Использование как можно более сильных промоторов и регуляторных участков ДНК, способствующих эухроматинизации области интеграции;
- 2) Проведение селективной или направленной интеграции генетических конструкций в транскрипционно активные области генома;
- 3) Амплификацию в геноме интегрированных генетических конструкций под действием возрастающих концентраций ингибитора селекционного маркера.

Применение первого и, в особенности, второго подхода позволяет ограничить продолжительность пассирования культуры до момента получения конечного клона-продуцента. В то же время, использование третьего подхода позволяет постепенно увеличивать уровень мРНК целевого гена до очень высоких значений, но требует увеличения времени культивирования.

Методика, позволяющая использовать преимущества всех трех вышеуказанных подходов, должна представлять большой практический интерес. Такая методика может быть основана на создании плазмидного вектора, обладающего следующими основными свойствами:

- 1) Сильный промотор целевого гена, минимально чувствительный к инактивации метилированием.
- 2) Наличие регуляторных участков ДНК, препятствующих гетерохроматинизации целевой ДНК.
- 3) Повышенная частота интеграции генетической конструкции в геном клеток.
- 4) Наличие селекционного маркера, позволяющего вести первичный отбор стабильно

трансфицированных клеток при различном уровне селекционного давления.

- 5) Возможность вести амплификацию трансгенов после получения первичной популяции стабильно трансфицированных клеток.

Векторная плаزمида, позволяющая вести экспрессию целевых генов в клетках СНО под контролем сильного промотора гена домашнего хозяйства клетки-хозяина, находящегося в контексте собственных регуляторных последовательностей, расположенных в 5' и 3'-нетранскрибируемых областях его исходного гена - фактора элонгации трансляции 1 альфа (*EEF1A1*), была описана в работе Бегущего Оленя и Аллисона [10] и названа pDEF38. Использование данной плазмиды позволило увеличить уровень секреции нескольких модельных белков в 6-35 раз по сравнению с аналогичными конструкциями на основе известных коровых областей промоторов цитомегаловируса (CMV) и фактора элонгации трансляции 1 (EF1) человека, при этом полученные линии-продуценты сохраняли постоянную продуктивность при последовательном пассировании в течение нескольких месяцев. В плазмиде pDEF38 в качестве селекционного маркера содержалась OPC DHFR мыши под контролем промотора и терминатора из лизирующего вируса обезьяны SV40. Селекционный маркер находился после сигнала полиаденилирования *EEF1A1*, но перед 3'-фланкирующим участком гена *EEF1A1*. Следствием такого расположения функциональных участков являлась невысокая генетическая сцепленность целевого гена и гена селекционного маркера, предположительно ограничивающая возможность амплификации целевого гена. Предположительно, при проведении амплификации построенных по такой схеме экспрессионных кассет под действием возрастающих концентраций ингибитора МТХ будет возможна инактивация или делеция целевого гена и последующая амплификация в геноме клетки хозяина только области селекционного маркера, включающей его вирусный промотор, OPC DHFR и терминатор транскрипции. Опубликованные данные о стабильности генетических кассет на основе *EEF1A1* и DHFR при амплификации под действием МТХ отсутствуют.

В литературе описаны способы увеличения сцепления амплифицируемого гена целевого белка и селекционного маркера – использование полученного в процессе трансляции гибридного белка, разделяющегося на целевой белок и белковый продукт селекционного маркера либо бицистронной мРНК. Первый способ был реализован путем соединения полипептидных последовательностей целевого белка и продукта селекционного маркера пептидом 2А [11]. Такой способ имеет неустраняемый недостаток – появление небольших количеств гибридного белка и целевого белка с неотделенным коротким пептидом р2В; такой дизайн генетической конструкции и не может быть использован для

получения биофармацевтических белков. Второй способ может быть реализован путем соединения кодирующих областей целевого гена и OРС DHFR внутренним сайтом связывания рибосом (internal ribosome entry site, IRES); он описан в работе [12]. Происхождение и эффективность работы IRES не имеют существенного значения для проведения амплификации, при конструировании данного функционального участка экспрессионного вектора может быть использован, например, аттенюированный IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV) [13].

Обычно практическая применимость экспрессионных векторов большой длины при получении стабильно трансфицированных продуцентов ограничена низкой эффективностью их трансфекции в животные клетки [14], а также небольшой вероятностью успешной интеграции экспрессионной кассеты в геном клетки. Поскольку небольшая часть нетрансфицированных клеток спонтанно приобретает устойчивость к действию селекционного агента и продолжает делиться в его присутствии, вероятность обнаружения клонов-продуцентов после первичного отбора становится незначительной при низкой частоте интеграции экспрессионной кассеты.

Одним из способов увеличения вероятности интеграции является включение в экспрессионный вектор сигнальных участков ДНК вирусов, отвечающих за интеграцию провируса в геном клетки-хозяина. Такой подход был описан в патенте США [15] на примере короткого фрагмента конкатемера концевых повторов вируса Эпштейна-Барр (EBV), созданного в работе [16]. Фрагмент конкатемера концевых повторов EBV был введен в стандартные экспрессионные плазмиды, кодирующие фармацевтически значимые белки различного размера под контролем промотора CMV и содержащие селекционный маркер DHFR под контролем промотора SV40. В качестве клеток-хозяев в работе [15] была использована специальная гибридная линия клеток человека НКВ11, содержащая геном EBV [17]. Присутствие в составе генетических конструкций концевых повторов из EBV вызывало повышение интенсивности продуктивной интеграции генетических кассет в геном продуцентов в 3-10 раз, в том числе и для плазмид с OРС фактора свертывания крови VIII человека, при этом эти повторы не оказывали прямого влияния на уровень секреции целевых белков. Для некоторых полученных стабильно трансфицированных клеточных популяций была продемонстрирована возможность проведения амплификации целевого гена под действием возрастающих концентраций MTX, однако влияние повторов EBV на ход амплификации и его общая эффективность не изучались.

Таким образом, существующий уровень исследований позволяет предположить, что плазмидные векторы, сочетающие высокий уровень транскрипции целевого гена,

способность относительно часто интегрироваться в геном животных клеток и многократно амплифицироваться под действием возрастающих концентраций ингибитора селекционного маркера могут быть получены путем комбинирования отдельных элементов из полученных ранее плазмид.

2.1.1. Промышленно пригодные методы культивирования клеток млекопитающих

В настоящее время при промышленном производстве биофармацевтических белков в культивируемых клетках млекопитающих используются три основных типа культивирования: простое периодическое (*batch*), периодическое с подпиткой (*fed batch*), квазинепрерывное (*perfusion*). Остальные методы культивирования клеток, например, полное хемотатирование, культивация в полуволоконных реакторах или культивация на трехмерной подложке пока не нашли практического применения, в основном из-за проблем масштабируемости или несоответствия регуляторным нормам.

При простом периодическом культивировании (*batch culture*) клетки и питательная среда добавляются в систему при старте процесса и инкубируются при перемешивании до окончания процесса без дальнейших манипуляций. Простая периодическая культура служит примером закрытой системы. Этот тип культивирования обладает минимальными рисками, относительно прост в исполнении и поэтому часто применяется для крупномасштабного размножения суспензионных культур, при промышленном применении продуктивная фаза культивации насчитывает обычно 2-4 дня. Однако из-за истощения питательных веществ и/или накопления токсичных продуктов веществ клеточная плотность и титр целевого продукта ограничены и составляют около 1-5 млн клеток на мл и до 200 мг/л, соответственно [18].

Контроль процесса может быть существенно улучшен при осуществлении периодического культивирования с подпиткой (*fed batch culture*), при котором в процессе культивации асептически добавляются питательные вещества, факторы роста или другие компоненты, увеличивающие выход продукта. При таком способе, например, снижая стартовую дозу глюкозы и глутамин и добавляя данные субстраты по мере их истощения, можно, во-первых, избежать падения их концентрации ниже физиологических норм и, во-вторых, минимизировать образование ингибирующих рост клеток катаболитов (лактат, ионы аммония). Метод можно также использовать в случае токсичности субстрата, поскольку в данном случае его концентрация в среде будет минимальна [41]. Имеются сведения о повышении клеточной плотности более 10 млн клеток/мл и достижении титра продукта

свыше 10 г/л при производстве моноклональных антител [15]. Периодическое культивирование с подпиткой наиболее часто находит применение в биотехнологической продукции рекомбинантных белков, поскольку обладает следующими преимуществами: сравнительно быстрая разработка метода и простая валидация (экономически выгодное время вывода на рынок – параметр *time to market*), возможность достижения высокого титра продукта при минимальном использовании ростовой среды, устойчивость метода в крупномасштабном производстве).

При непрерывном процессе культивирования (*continuous culture*) происходит постоянное или с некоторой периодичностью добавление свежей ростовой среды и удаление соответствующего объема среды из системы, но не биомассы клеток; при этом объем среды культивации остается постоянным. Такой способ, обозначаемый как перфузия, обеспечивает оптимальные условия в течение всего времени работы биореактора, которое может насчитывать несколько месяцев. В перфузионном режиме могут быть достигнуты самые высокие клеточные плотности и титр целевого продукта [3]. Такой режим с легкостью применим не только для прикрепленных, но и для суспензионных культур при наличии системы задержки биомассы – мембранные, ультразвуковые фильтры, центрифуги и пр., которые осуществляют сепарацию по размеру или плотности [33, 40]. Целесообразно использовать данный режим для продукции лабильных белков (например, фактора свертывания крови VIII, время полураспада в ростовой среде около суток) или в тех случаях, когда необходимо достижение особенно высоких клеточных плотностей. Следует отметить, что процесс культивирования *fed batch* обычно позволяет получить максимальный объемный титр продукта, а процесс культивирования *perfusion* – максимальное количество продукта с единицы объема биореактора за единицу времени, концентрация же продукта в кондиционированной среде обычно оказывается существенно ниже, чем в случае корректно разработанного *fed batch* процесса. В большинстве случаев при проведении перфузионного процесса культивирования животных клеток часть клеточной биомассы периодически удаляют вместе с кондиционированной средой, данный прием, называемый *cell bleed*, позволяет поддерживать концентрацию клеток на приблизительно одинаковых уровнях в течение продолжительного времени и ограничивать контактное торможение деления клетки вызываемую им ускоренную клеточную смерть.

2.2. Фактор VII свертывания крови

Фактор VII свертывания крови человека (фVII) в активированной форме (фVIIa) является сериновой протеазой, содержащей Gla-домен, включающий 10 остатков гамма-

карбоксиглутаминовой кислоты (Gla). Фактор VII непосредственно инициирует процесс свертывания крови путем Ca^{2+} -зависимого связывания с трансмембранным белком фактор III (фIII, тканевой фактор, белковый компонент тромбопластина), экспонированным на поверхности практически всех клеток млекопитающих, кроме эндотелия сосудов. Связанные с фIII молекулы фVII на поверхности мембран клеток, вступивших в контакт с кровью из поврежденных сосудов, подвергаются протеолитической активации мембрано-связанными протеазами. Образующийся ферментный комплекс, называемый теназой внешнего пути, способен активировать факторы IX и X, которые, в свою очередь, собираются в состав следующих ферментных комплексов – теназы внутреннего пути и протромбиназы. Продуктом работы протромбиназы является активная сериновая протеаза тромбин, непосредственно превращающая растворимый белок фибриноген в основной компонент тромба – фибрин. При ингибиторной форме гемофилии A и в ряде других клинических ситуаций нормальная работа механизма гемостаза нарушается и теназа внутреннего пути не может синтезировать необходимое количество фIXa и тромбина, вследствие чего скорость роста тромба оказывается недостаточной для остановки кровотечения. При введении в системную циркуляцию нескольких миллиграмм фVIIa рост тромба становится возможным только за счет прямой генерации фIXa теназой внешнего пути и даже обширные кровотечения могут быть остановлены в течение 10-30 мин.

2.3. Фактор VIII свертывания крови

Фактор свертывания крови VIII (фVIII) - это неэнзиматический кофактор фактора IXa, который после протеолитической активации до фактора VIIIa образует с фактором IXa плотный белок-белковый нековалентный комплекс, связывающий и активирующий фактор X. Этот комплекс белков - основной элемент петли положительной обратной связи в каскаде свертывания крови. Дефекты гена *FVIII* могут приводить к возникновению гемофилии A – X-связанного рецессивного генетического заболевания. Распространенность гемофилии A около 1 случая на 5000 мужчин. Примерно половина всех случаев гемофилии A вызывается инверсиями небольших фрагментов ДНК в интроне 22 [19], еще около 5% - инверсиями в интроне 1, частотность остальных вариантов мутаций намного ниже. По состоянию на май 2019 года в базе данных SHAMP описано 2930 различных мутаций гена *FVIII*, проявляющиеся как гемофилия A [20, 21].

Единственная эффективная терапия гемофилии A – это регулярные заместительные инъекции лекарственных препаратов фVIII. Традиционный источник фVIII – донорская плазма крови, количество которой ограничено. Что более существенно, использование донорской плазмы как сырья для получения терапевтических белков порождает риск

передачи пациентам вирусных [22, 23] и прионных [24] инфекций, несмотря на тщательный скрининг единиц заготовленной плазмы и множественные процедуры инактивации вирусов. Рекомбинантный фактор VIII человека с очевидностью менее подвержен вирусной контаминации, он может быть получен в культивируемых клетках млекопитающих, очищен до фармакопейных показателей методом аффинной хроматографии и нескольких стадий ионообменной и гидрофобной хроматографии, а также подвергнут вирус-инактивации при помощи обработки детергентом и растворителем и финишной нанофилтрации или прогреванию. Варианты рекомбинантного фVIII человека, допущенные к медицинскому применению получены в клетках почки новорожденного хомяка (ВНК) либо CHO и считаются полностью эквивалентными фVIII из донорской плазмы при проведении заместительной терапии.

Основной недостаток существующих методов получения рекомбинантного фVIII человека - это крайне низкий уровень экспрессии его гена, вызванный, по всей видимости, большим размером целевого белка, наличием транскрипционных сайленсеров и сложным набором пост-трансляционных модификаций фVIII. Удаление области домена В, составляющего значительную часть молекулы фVIII, из его гена не уменьшает удельную прокоагуляционную активность фVIII, а его период полувыведения из плазмы крови практически не уменьшается [25]. Замена домена В на небольшой линкерный пептид, обычно обозначаемый как SQ, приводит к многократному увеличению уровня продукции фVIII в клетках CHO и почти полному протеолитическому распаду одноцепочечного белка-предшественника до зрелой двухцепочечной формы фVIII. [26]. Медицинский препарат фактора VIII с делецией домена В (фFVIII BDD SQ) был допущен к медицинскому применению под торговым названием «Рефакто»; его показатели эффективности и безопасности были аналогичны таковым для препаратов полноразмерного рекомбинантного фVIII человека [27]. Типичный уровень продуктивности для клеток линии CHO, продуцирующих фVIII BDD SQ составлял 0.5-1 МЕ/мл по данным [26]; в независимо проведенной работе [28] для наилучшего клонального продуцента BDD-фVIII был зафиксирован сходный уровень продуктивности 0.5-2 мкМЕ/клетка/день, что соответствует концентрации фVIII около 0,2 мкг/мл и на несколько порядков уступает продуктивности промышленных продуцентов других рекомбинантных факторов свертывания крови (VII, IX).

2.3.1. Полноразмерный рекомбинантный фVIII

Лекарственные препараты рекомбинантного полноразмерного фVIII были практически одновременно разработаны биотехнологическими компаниями Genetics Institute

и Genentech на основе систем экспрессии гена фVIII в клетках СНО и ВНК [29, 30], соответственно, и одобрены для клинического применения в 1993 г. с международным непатентуемым названием (МНН) «октоког альфа». Рекомбинантный фVIII, секретируемый клетками СНО в комплексе с рекомбинантным ффВ [31, 32] выпускается под торговыми названиями Recombinate и Bioclote. Рекомбинантный фVIII, секретируемый клетками ВНК в культуральную среду, содержащую природный ффВ человека [29], выпускается под торговыми названиями Kogenate и Helixate.

В настоящий момент различают четыре поколения лекарственных препаратов рекомбинантных факторов свертывания крови [33, 34]: препараты первого поколения содержат человеческий сывороточный альбумин и контактируют с веществами животного происхождения в процессе производства, в препаратах второго поколения готовая лекарственная форма не содержит альбумина в качестве вспомогательного вещества, в препаратах третьего поколения контакт с веществами животного происхождения и компонентами донорской плазмы исключен во всем процессе производства, в препаратах четвертого поколения используются культивируемые клетки человека (Таблица 2). Предположительно, минимизация использования компонентов плазмы и белков животного происхождения может уменьшить риск инфицирования пациентов вирусами и прионами [35]. На настоящий момент нет ни одного подтвержденного факта передачи данных инфекционных агентов при использовании рекомбинантных препаратов фVIII первого и второго поколения. Использование культивируемых клеток человека позволяет приблизить профиль гликозилирования у рекомбинантного фVIII к природным показателям и по мнению владельцев данных препаратов это может уменьшить их иммуногенность для пациентов, но к настоящему моменту данное предположение еще не нашло ясного экспериментального подтверждения.

Процессы получения препаратов полноразмерного рекомбинантного фVIII включают в себя несколько стадий ионообменной хроматографии, аффинную хроматографию на иммобилизованных моноклональных антителах и стадии инактивации вирусов при помощи обработки растворителем и детергентом или пастеризацией в присутствии детергента [36, 37]. Поскольку препараты рекомбинантного фVIII неизбежно содержат следовые количества белков продуцента и IgG мыши, в ходе клинических испытаний исследовали появление у пациентов антител к этим примесям и влияние таких антител на эффективность терапии. У части больных фиксировалось появление антител, однако связь между иммунным ответом к примесным белкам и эффективностью терапии не была установлена [33].

Можно отметить, что перевод ранее разработанных лекарственных препаратов фVIII из одного поколения в другое возможен не только за счет изменения условий культивирования, очистки и формуляции, но и путем генетической модификации клеток-продуцентов, в частности, компания Bayer провела трансформацию лекарственного препарата Kogenate в препарат Kovaltry, проведя трансфекцию в клетки-продуценты гена шаперона HSP70 человека и адаптировав новую линию клеток к бессывороточной среде [38].

Таблица 2. Лекарственные препараты рекомбинантного фVIII

Название	Kogenate®, Helixate®	Kogenate FS®, Kogenate Bayer®, Helixate FS®, Helixate	Recombinate® , Bioclote®	Advate®	ReFacto®	Xyntha®, ReFacto AF®	Nunwiq®
Производитель	Bayer Healthcare		Baxter		Pfizer		Octapharma AB
Поколение	1	2	1	3	2	3	4
Разрешение на продажу в США	1993	2000	1992	2003	2000	2008	2015
Линия-продуцент	ВНК		CHO		CHO		HEK 293F
Гетерологичные гены	фVIII		фVIII, ффВ		фVIII BDD SQ		фVIII BDD
Белки в культуральной среде	Белки плазмы крови человека		БСА, апротинин	Нет	БСА	Нет	Нет
Иммуноаффинная хроматография	Да		Да		Да	Нет	Да
Стабилизатор	ЧСА	Сахароза	ЧСА	Маннитол, трегалоза	Сахароза		Сахароза
Вирус-инактивация	ДР		Пастеризация	ДР	ДР	ДР, НФ	ДР, НФ

Примечание. ЧСА – человеческий сывороточный альбумин, БСА – бычий сывороточный альбумин, ДР – обработка детергентом и растворителем, НФ – наночастицы.

2.3.2. Рекомбинантный фVIII с делецией В-домена

Природный фVIII, циркулирующий в кровотоке, содержит множественные формы укороченного В-домена, образующиеся при протеолизе полноразмерной двухцепочечной молекулы, и прокоагуляционные свойства таких вариантов фVIII не имеют существенных различий [39]. В ряде работ были получены и охарактеризованы варианты рекомбинантного фVIII с направленной делецией области В-домена. В работе группы Кауфмана из кДНК фVIII был удален участок, кодирующий аминокислоты 790-1639, то есть практически всю область В-домена [39]. Уровень прокоагуляционной активности фVIII в кондиционированной среде для клеток COS-1, трансфицированных плазмидой с кДНК делеционной формы фVIII (вариант LA-VIII) был увеличен приблизительно в 10 раз по

сравнению с контрольной линией, трансфицированной аналогичной плазмидой, кодирующей полноразмерный фVIII. При дальнейших исследованиях варианта фVIII LA-VIII установлено, что он полностью аналогичен природному фVIII по биохимическим свойствам, за исключением повышенной чувствительности легкой цепи LA-VIII к расщеплению тромбином [25]. Для более продуктивных линий-продуцентов фVIII делеция В-домена по варианту LA-VIII приводила к увеличению уровня мРНК фVIII в 17 раз, но только лишь 30% увеличению концентрации секретированного продукта [40]. Сходные данные были получены для варианта фVIII deltaII, содержащего делецию 771-1666 [41], при этом уровень секреции фVIII в клетках ВНК достигал 0,6 МЕ/мл, а секретированный продукт содержал в основном одноцепочечную форму 170 кДа и две дополнительных формы тяжелой цепи 120 кДа и 90 кДа [42]. Аналогичное преимущественное накопление одноцепочечной формы фVIII также зафиксировано при делеции участка 741-1668 [43]. Частичная делеция В-домена по остаткам 797-1562 (вариант 90-142-80) также приводила к появлению полностью активного фVIII [44], однако данный вариант делеции В-домена при инъекции кроликам вызывал появление специфических антител к линкерной области белка [45], что могло потенциально увеличить частоту появления ингибиторных антител при терапевтическом применении.

Для большинства опубликованных гетерологических систем экспрессии фVIII с делецией В-домена авторы отмечали многократное увеличение уровня секреции продукта в сравнении с полноразмерным фVIII, в случае делеции области 741-1668 такого изменения не наблюдалось, однако при замене клеток-продуцентов с СНО на линию клеток SK-HEP-1 уровень секреции этого делеционного варианта фVIII был увеличен до 3,5 мкМЕ/клетка/день [46]. Интересно отметить, что отдельная экспрессия в клетках СНО генов, кодирующих укороченную тяжелую и полную легкую цепи фVIII, позволяет достигнуть уровня экспрессии 15 мкМЕ/клетка/день [47] и единственным, но неустраняемым ограничением такой системы экспрессии фVIII остается загрязнение продукта непротрансформированной формой легкой цепи размером 90 кДа, по-видимому содержащей гетерологичный препропептид.

Очевидным способом создания рекомбинантного фVIII, не содержащего как В-домена, так и «неприродного» линкерного участка между тяжелой и легкой цепями, являлось определение таких точек начала и конца области делеции, которые позволили бы сохранить доступность доминантных сайтов расщепления природного фVIII до его «минимальной» двухцепочечной формы – Arg740 и Glu1649. В работе Линда и соавторов [26] при систематическом переборе вариантов делеции В-домена обнаружено, что высокий уровень процессинга одноцепочечного предшественника фVIII по данным сайтам достигается при

проведении делеции В-домена по остаткам 744-1637 (вариант BDD SQ), при одновременном отсутствии значимого протеолитического распада цепей по другим сайтам. В данном варианте делеции В-домена точка соединения полипептидных последовательностей тяжелой и легкой цепи фVIII была помещена в середину отделяющегося линкерного пептида длиной 14 аминокислот. N-концевое секвенирование легкой цепи секретированного фVIII BDD SQ показало преимущественное расщепление предшественника по сайтам Glu1649 и Asp1658, то есть совпадение N-концевого участка легкой цепи с природной последовательностью. Для тяжелой цепи фVIII BDD SQ было продемонстрировано присутствие С-концевого участка 729-740 и частичное присутствие линкерного пептида [48]; таким образом, данный вариант делеции В-домена позволял наиболее точно реконструировать присутствующий в кровотоке «минимальный» двухцепочечный вариант фVIII. Для очищенного препарата фVIII BDD SQ были получены варианты лекарственной формы в виде раствора с высоким содержанием сахаридов [49] и безальбуминового лиофилизата [50]. Лيوфилизованная форма BDD SQ сохраняла стабильность два года [51] и была использована для последующих клинических испытаний, продемонстрировавших фармакологическую эффективность и безопасность препарата [52]. Вместе с тем, время полураспада в кровотоке делеционной формы фVIII BDD SQ (международное непатентованное название «мороктоког альфа») было немного меньше, чем полноразмерного фVIII из донорской плазмы.

Исходный вариант промышленного процесса получения фVIII BDD SQ для медицинского применения (торговое название ReFacto) включал в себя культивирование клеток-продуцентов на основе CHO в перфузионных биореакторах, индукцию экспрессии гена фVIII BDD SQ добавлением бутирата натрия при одновременном понижении температуры (по косвенным данным) и выделение целевого белка в ходе пяти стадий хроматографии [53]. Вирус-инактивацию проводили при помощи обработки промежуточного продукта детергентом и растворителем. Продуктивность разработанной линии-продуцента фVIII BDD SQ не сообщалась; аналогичная линия-продуцент на основе клеток CHO, полученная независимо, обладала продуктивностью 0,5-2 МЕ/мл при культивировании в бессывороточной среде без индукции [28] и до 10 МЕ/мл при индукции экспрессии продукта пропионатом натрия или бутиратом натрия.

При последующей модификации промышленного процесса получения фVIII BDD SQ стадия Иммуноаффинная хроматографии на моноклональных антителах была заменена на более безопасную стадию аффинной очистки на иммобилизованном коротком пептиде [54] (торговые названия продукта Xyntha, ReFacto RS).

Эффективность и безопасность лекарственных препаратов фVIII BDD SQ, вполне подтвержденная в ходе клинических испытаний [55-57], впоследствии была подвергнута сомнению при мета-анализе данных множественных пост-регистрационных исследований. В работе Группо и соавторов [58] установлено, что профилактическое использование фVIII BDD SQ вместо полноразмерного фVIII приводит к статистически достоверному повышению риска внезапных кровотечений. Робастность примененного авторами алгоритма мета-анализа была рассмотрена в отдельной публикации и подтверждена ими для широкого диапазона коэффициентов пересчета числа случаев кровотечений, зафиксированных в различных исследованиях [59]. Одной из возможных причин пониженной эффективности фVIII BDD SQ при профилактическом применении могло быть некорректное измерение уровня активности фVIII в плазме пациентов, вызванное использованием различных методов коагулометрии и стандартов прокоагуляционной активности фVIII [60], другой предположительной причиной можно считать уменьшенное время полураспада фVIII BDD SQ [61], вызываемое ускоренной инактивацией активированного фVIII BDD SQ фХа и APC [62].

При исследованиях другого существенного показателя безопасности лекарственных препаратов фVIII – риска появления ингибиторов, для фVIII BDD SQ были собраны несколько противоречивые данные. В части исследований зафиксированная частота возникновения ингибиторов была близка для всех вариантов рекомбинантного фVIII [63-65], в других отмечался повышенный риск появления ингибиторов для фVIII BDD SQ [66]. Поскольку вероятность появления ингибиторов сильно варьирует в зависимости от типа мутации, вызвавшей гемофилию, наличия определенных HLA-генотипов и особенностей ведения заместительной терапии, данные разных центров по лечению гемофилии могут сильно различаться между собой [67] из-за небольших размеров групп пациентов для каждого центра.

Аналогичный фVIII BDD SQ вариант фVIII с делецией участка 751-1637 (вариант N8) позднее был получен при экспрессии в клетках CHO [68] и использован для проведения клинических испытаний, продемонстрировавших биоэквивалентность N8 и препарата сравнения – полноразмерного рекомбинантного фVIII на группе из 23 пациентов при однократном введении [69]. Еще одна промышленно применимая система экспрессии гена делеционного варианта фVIII была получена при помощи клеток линии человека HEK293F, при этом ген фVIII содержал не прямую делецию области В-домена, а замену участка 747-1648 на «неприродный» пептид QAYRYRRQ [70], вариант «human-cl». Предполагалось, что присутствие в искусственном линкерном пептиде сайтов процессинга протеиназ семейства

RACE/furin позволит увеличить уровень распада одноцепочечной формы фVIII, однако приведенные авторами данные показывают, что степень процессинга одноцепочечной формы для вариантов BDD SQ и human-cl практически не различается. По-видимому, самая продуктивная на настоящий момент система экспрессии делеционного варианта фVIII была получена при помощи специальных гибридных клеток человека НКВ11; для делеционного варианта фVIII 90-142-80 удельная продуктивность клональных линий составила 5-10 мкМЕ/клетка/день [71, 72].

Исследования уровней экспрессии генов делеционных вариантов фVIII с удалением только С-концевых частей В-домена показали, что вариант фVIII, содержащий первые 226 аминокислот В-домена и 6 сайтов N-гликозилирования (вариант 226aa/N6), секретруется клетками линии СНО в 5 раз более эффективно, чем фVIII с полной делецией В-домена. Этот эффект может быть объяснен улучшением транспорта белка-предшественника из ЭПР в аппарат Гольджи [73] (по сравнению с полноразмерной формой) и уменьшением адсорбции секретированного фVIII на поверхность мембраны клеток-продуцентов [74] (по сравнению с обычными делеционными вариантами). Для линий-продуцентов варианта 226aa/N6 на основе клеток СНО была достигнута продуктивность 11 МЕ/мл без использования индукции экспрессии целевого гена и 15,7 МЕ/мл для среды, содержащей сыворотку [75].

2.3.3. Лекарственные препараты фVIII пролонгированного действия

Существенным ограничением эффективности заместительной терапии гемофилии А, ведущейся в режиме профилактики, является так называемая *third day problem* – падение уровня фVIII через 2 дня после внутривенной инъекции, сделанной в пятницу, до значений, не позволяющих контролировать кровотечения. Считается, что даже полуторакратное увеличение периода полувыведения рекомбинантного фVIII из циркуляции существенно ослабит остроту проблемы третьего дня и позволит многократно уменьшить число эпизодов неконтролируемого кровотечения у пациентов в режиме профилактики. К настоящему моменту в клиническую практику были введены три различных препарата рекомбинантного фVIII пролонгированного действия (*extended half-life, EHL*) – конъюгат полноразмерного фVIII с ПЭГ *Adynovate*; слитые в рамке фVIII-BDD и кристаллизуемый фрагмент иммуноглобулина (фVIII-BDD-Fc) *Eloctate*; а также одноцепочечный вариант фVIII *Afstyla* [76]. Несмотря на огромный объем проведенных исследований и разработок, ни один из этих препаратов не смог преодолеть ключевую отметку – период полувыведения более 24 ч. Для интактного фVIII-BDD продолжительность периода полувыведения определена как 14.5 ± 5.3 ч, а для фVIII-BDD-Fc – как $19,7 \pm 2,3$ ч. По-видимому, следующая группа EHL-

вариантов фVIII сможет получить требуемый период полувыведения, однако на настоящий момент доступность препаратов полноразмерного фVIII и фVIII-BDD представляется более значимой для успеха профилактических режимов терапии, чем возможность увеличить интервалы между инъекциями.

2.3.4. Факторы, ограничивающие продуктивность систем гетерологической экспрессии фVIII

Сильное понижение уровня транскрипции искусственных генов, содержащих ОРС фVIII впервые описано при культивации ретровирусных векторов [77, 78]. Присутствие ОРС фVIII не вызывало уменьшения уровня инициации транскрипции, однако фрагмент ОРС размером 1,2 т.п.н. вызывал 30-100 кратное понижение эффективности элонгации транскрипции. Обнаруженный эффект был ориентационно-зависимым, в существенной степени зависимым от положения и делокализованным – удаление различных частей исследуемого фрагмента ОРС вызывало частичное восстановление уровня элонгации транскрипции. Позднее в другой области ОРС фVIII был описан ориентационно-независимый транскрипционный сайленсер длиной 305 п.н. [79], активность которого подавлялась при помощи бутирата натрия [80], что позволяло увеличить уровень секреции фVIII в культуре клеток приблизительно в 6 раз (2,5 раза в более ранней работе [81]). Увеличение уровня фVIII в лизате клеток ранее отмечалось при обработке культуры интактных фибробластов 3Т3 бутиратом натрия [82] и, таким образом, не может быть связано с особенностями структуры оверэкспрессируемых искусственных генов фVIII. Наличие такого управляемого элемента контроля уровня транскрипции в ОРС фVIII является препятствием для получения эффективных терапевтических вирусных векторов, но представляет определенные преимущества при биосинтезе фVIII в культивируемых клетках. Стресс, вызываемый процессингом предшественника фVIII, может быть ограничен подавлением транскрипции гена фVIII для делящейся культуры, а последующая индукция экспрессии фVIII при помощи добавления бутирата натрия подвергает стрессу только плотную неделяющуюся культуру клеток.

Оптимизация кодонов кодирующей области мРНК фVIII была исследована в работе [83]. Замена части кодонов на наиболее частотные для *H.sapiens* и одновременное удаление из кодирующей области мРНК внутренних ТАТА-боксов, СНI-сайтов, сайтов связывания рибосом, криптических сайтов сплайсинга и т.п. привели к увеличению уровня FVIII:C в 7-30 раз, одновременно с этим для делеционного варианта фVIII BDD SQ наблюдалось увеличение отношения FVIII:Ag к FVIII:C с $1,27 \pm 0,3$ до $2,35 \pm 0,49$, что может указывать на

достижение практического предела продуктивности использованной в работе линии клеток 293 и появлению в культуральной среде нефункционального белка.

Предшественник фVIII в люмене ЭПР образует прочный комплекс с мажорным шапероном ЭПР GRP78 (glucose-regulated protein MW 78,000), также называемым BiP (imMunoglobulin-binding protein) [84], одним из основных участников сигнального пути UPR (unfolded protein response). Оверэкспрессия гена фVIII индуцирует транскрипцию гена BiP [81], причем уровень BiP в клетке обратно пропорционален уровню секреции фактора фVIII в довольно широком диапазоне [85, 86]. Подавление экспрессии BiP при помощи shRNA увеличивало уровень секреции фVIII человека [87] приблизительно в 2 раза при одновременном снижении числа копий мРНК фVIII приблизительно на 65%. Аналогичный эффект наблюдался и при оверэкспрессии гена XBP1, продукт которого также участвует в UPR.

Оверэкспрессия гена шаперона Hsp70 увеличивает уровень секреции фVIII и уменьшает индукцию апоптоза в плотной культуре продуцентов фVIII на основе клеток линии ВНК [88]. Аналогичные данные получены при оверэкспрессии анти-апоптотических генов Aven и E1B-19K [89], тогда как для линии гибридных клеток человека НКВ11, продуцирующих фVIII, не отмечалось значимых изменений уровня экспрессии Hsp70 и анти-апоптотических генов Bcl-2, Bcl-xL среди клонов с различным уровнем секреции фVIII [72]. Таким образом, данный путь анти-апоптотического реинжиниринга продуцентов фVIII может быть эффективен только для сверхплотных культур клеток ВНК.

Подавление антиоксидантами окислительного стресса в ЭПР, а также вызываемых им UPR и апоптоза в клетках СНО при оверэкспрессии фVIII показано в работе [90]. Введение в культуральную среду антиоксиданта бутилата гидроксианизола одновременно с индуктором экспрессии гена фVIII бутиратом натрия позволило увеличить уровень секреции полноразмерного фVIII в 4 раза. Проявления окислительного стресса были зафиксированы и для варианта фVIII с полной делецией В-домена, но не для варианта 226/N6.

Увеличение секреции фVIII при ограничении интенсивности UPR, окислительного стресса и апоптоза продуцентов также может быть связано с изменением уровня адсорбции фVIII на внешнюю мембрану клеток. В ходе опытов с клетками СНО, секретирующими полноразмерный фVIII, установлено, что добавление к культуральной среде ффВ свиньи увеличивало концентрацию фVIII в бессывороточном супернатанте в 4 раза [32], таким образом не менее $\frac{3}{4}$ всего секретируемого фVIII оставалось связанным с мембраной клеток. Фактор VIII преимущественно связывается с фосфолипидными мембранами, содержащими фосфатидилсерин, для мембран активированных тромбоцитов константы диссоциации фVIII,

фVIII BDD SQ и фVIIIa составляют 10,4; 5,1; 1,7 нМ, соответственно [91]. Увеличение адсорбции фVIII на мембрану апоптотических клеток показано методом проточной цитофлуориметрии – подавление апоптоза клеток-продуцентов путем оверэкспрессии гена Hsp70 приводило к падению уровня адсорбции полноразмерного фVIII мембраной и увеличению его концентрации в культуральной среде [91]. Для систем экспрессии фVIII-BDD адсорбция на мембране клеток носит более выраженный характер и может превышать 90% для варианта N0, при этом частичная делеция В-домена вместо полной позволяет уменьшить адсорбцию до ~50% при одновременном падении общего уровня экспрессии фVIII приблизительно вдвое [74]. Потери секретированного фVIII N0 на мембране продуцентов также могут быть уменьшены блокированием его взаимодействия с фосфатидилсерином при добавлении к культуральной среде ффВ, аннексина V или о-фосфо-L-серина [92].

2.4. Фактор IX свертывания крови человека.

Фактор IX свертывания крови (фIX, фактор Кристмаса) является проферментом сериновой протеиназы, которая в присутствии Ca^{2+} и мембранных фосфолипидов гидролизует связь аргинин-изолейцин фактора X с образованием активированного фактора X (FXa) [93]. Каталитическая эффективность активированного фIX (фIXa) сильно возрастает при связывании кофактора - активированного фактора свертывания крови VIII (фVIIIa). Нековалентный комплекс фIXa, фVIIIa и фX, связанных с фосфолипидной мембраной, называется "X-аза" или "теназа" и представляет собой основной элемент петли положительной обратной связи в каскаде свертывания крови (рис. 1).

Фактор IX синтезируется в печени в виде неактивного белка-предшественника, который процессируется в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи, где подвергается множественным пост-трансляционным модификациям различных типов и секретируется в кровотоки после протеолитического отщепления пропептида. Циркулирующий зрелый фIX обладает молекулярной массой 57 кДа и средней концентрацией в плазме крови около 90 нМ. В каскаде свертывания крови фIX активируется после протеолитического расщепления активированным фактором XI (внутренний путь) или активированным фактором VII (внешний путь) с образованием двух полипептидных цепей, связанных дисульфидной связью. Активированный фIX постепенно инактивируется, в основном путем медленного связывания с антитромбином III, нексином-2, белок Z-зависимым ингибитором протеаз и рецепторами эндоцитоза гепатоцитов, а также подвергается расщеплению эластазой нейтрофилов [94].

Ген фактора IX человека, длиной 33.5 т.п.н., содержит 8 экзонов и расположен на X-хромосоме. Различные мутации единственной копии этого гена, приводящие к нарушению функции кодируемого белка, обуславливают нарушение системы свертывания крови - гемофилию В. Список мутаций гена фIX, выявляемых у больных гемофилией В, приведен в специализированной базе данных [95]. Тяжелая форма гемофилии В, требующая регулярной заместительной терапии, встречается с частотой 1 случай на 30 тыс. мужчин, что составляет около 20% от всех больных гемофилией. Недавно установлено, что представители европейских королевских семей страдали именно гемофилией В и последний предполагаемый носитель заболевания скончался в 1940 г [96]. В данном роду заболевание было обусловлено точечной мутацией, вызывавшей альтернативный сплайсинг мРНК фIX и появление укороченной формы белка.

В некоторых случаях мутации в области промотора гена приводят к менее тяжелой форме гемофилии В «Лейден» [97], характеризующейся почти полным отсутствием фIX в детстве и устойчивым увеличением уровня фIX в период полового созревания до близких к норме значений.

Современная практика лечения гемофилии В сводится к заместительной белковой терапии, исключительно дорогостоящей для пациентов и системы здравоохранения. Всего лишь около 20% от мировой популяции больных гемофилией В могут оплачивать такую терапию и гемофилия В до сих пор смертельна для детей из слаборазвитых стран [98].

2.4.1. Заместительная терапия гемофилии В

Первоначально терапия гемофилии В ограничивалась периодическими переливаниями плазмы крови, впоследствии замененными на более эффективные концентраты протромбинового комплекса (КПК) – смеси витамин К-зависимых (ВКЗ) факторов свертывания крови IX, II, VII и X. Основным ограничением такой терапии являлся существенный риск развития тромботических эпизодов. Лекарственные препараты фIX с большей степенью чистоты были получены из фракций плазмы крови, разделяемой методом Кона, при помощи дополнительной очистки ионообменной хроматографией. Безопасность всех лекарственных препаратов фIX, получаемых из донорской плазмы, была существенно улучшена после внедрения процессов вирус-инактивации, включающих прогревание, обработку тиоцианатом натрия или детергентом и растворителем для удаления оболочечных вирусов, а также процесса наночистоты для удаления безоболочечных вирусов [99].

Безопасность плазменных концентратов фIX также лимитируется наличием существенного уровня примеси активированного фIX (фIXа) и остаточных количеств других факторов свертывания, достаточных для увеличения риска возникновения тромботических

эпизодов. Дополнительная очистка фIX при помощи иммуноаффинной хроматографии позволяет полностью удалить эти примеси [100], однако, как и в случаях других продуктов переработки плазмы крови, риск вирусного или прионного инфицирования пациентов не может быть полностью устранен [101].

2.4.2. Рекомбинантный фIX

Клонирование кДНК фIX осуществлено в 1982 г. [102], вслед за этим в 1985 г. были получены клеточные линии на основе клеток гепатомы крысы, фибробластов мыши и линии ВНК, секретирующие биологически активный фIX в культуральную среду [103-105]. В 1986 г. была получена линия-продуцент фIX в клетках линии СНО, пригодной для промышленного культивирования [106].

В настоящий момент в мире существуют два зарегистрированных лекарственных препарата рекомбинантного фIX, первый из них – нонаког альфа (торговое название BeneFIX, производитель - Wyeth), одобренный для применения в США и странах ЕС в 1997 г. Нонаког альфа получают в клетках СНО, культивируемых в питательной среде, не содержащей сыворотки или других продуктов животного происхождения. Выделение и очистку рекомбинантного фIX проводят при помощи четырех хроматографических стадий, не используя иммуноаффинную хроматографию, и удаляют потенциально присутствующие вирусы при помощи нанофльтрации на фильтре с порогом отсека 70 кДа [107]. В готовой лекарственной форме нонакога альфа не используется альбумин человека, таким образом во всем процессе получения лекарственного препарата исключено использование веществ животного происхождения и компонентов донорской плазмы [108]. Исходные варианты готовой лекарственной формы рекомбинантного фIX были рассчитаны на изготовление флаконов, содержащих 250-1000 МЕ лиофилизованного белка, в дальнейшем был разработан вариант фармацевтической композиции, позволяющий увеличить содержание основного вещества до 2000 МЕ на флакон [109] и хранить препарат при комнатной температуре.

Клинические испытания BeneFIX показали, что безопасность и клиническая эффективность рекомбинантного и получаемого из плазмы крови вариантов фIX не имеет существенных различий. После проведения 1514 инфузий рекомбинантного фIX 56 пациентам не выявлено ни одного случая заражения вирусной инфекцией [110]. Уровень иммунного ответа на вводимый препарат также был сходен для рекомбинантного фIX и получаемого из плазмы крови [111].

Структурные различия рекомбинантного и природного фIX, а также функциональная значимость таких различий были подробно исследованы в ряде работ. Первоначально было

установлено, что структура рекомбинантного и природного фІХ весьма сходна [112]. В то же время уровень восстановления активности фІХ *in vivo* после инфузии рекомбинантного препарата был значительно ниже, чем при использовании природного фІХ [113], что привело к увеличению рекомендуемой терапевтической дозы рекомбинантного фІХ в 1.5-2 раза относительно природного [114]. Детальное сравнение паттернов пост-трансляционных модификаций для партий рекомбинантного фІХ, полученных на двух различных производственных площадках, не выявило никаких структурных различий [115], таким образом, различия природного и рекомбинантного фІХ не могут быть обусловлены особенностями процессов производства.

Другой вариант рекомбинантного фІХ был позднее зарегистрирован компанией Baxter (права на препарат переданы Shire, затем Takeda) по результатам полных клинических испытаний, МНН наонаког гамма, торговое название Rixubis. Этот продукт также производится при помощи клеток СНО, ко-экспрессирующих ген интактной PACE/furin человека. Сравнительные клинические исследования BeneFIX и Rixubis не выявили значимых различий между ними, при этом тромбогенный потенциал Rixubis в тесте на кроликах был ниже, чем у BeneFIX; авторы исследования связывают это различие с различным содержанием фІХа в тестируемых препаратах [116].

2.4.3. Структура и пост-трансляционные модификации фІХ

Фактор ІХ принадлежит к семейству витамин К-зависимых (ВКЗ) факторов свертывания крови и состоит из четырех структурных доменов – домена Gla, двух ЭФР-подобных доменов и С-концевого домена сериновой протеиназы (Рис. 2). N-концевой лидерный пептид фІХ отделяется при транслокации полипептида в эндоплазматический ретикулум, пропетид, непосредственно предшествующий домену Gla, отделяется при секреции зрелого белка. Активационный пептид, расположенный между вторым ЭФР-подобным доменом и доменом сериновой протеазы, специфически отделяется факторами XIa или VIIa при активации фІХ.

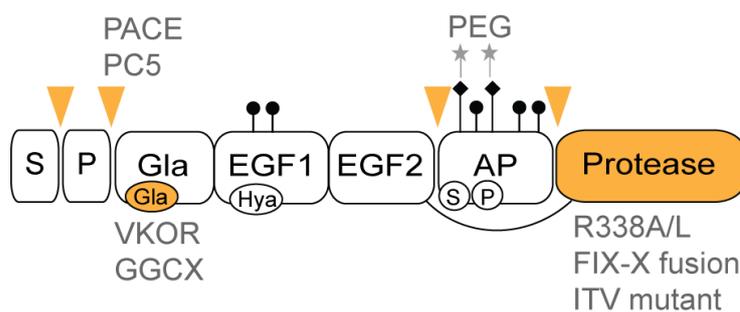


Рисунок 2. Структура фIX. Обозначения: S – сигнальный пептид, P – пропептид, Gla – домен Gla domain, EGF1 и EGF2 – ЭФР-подобные домены, AP – активационный пептид, Protease – домен сериновой протеазы. Сайты пост-трансляционных модификаций: Gla – γ -карбоксилирование, Hya – β -гидроксилирование; S – сульфатирование, P – фосфорилирование, \blacklozenge – N-связанное и \bullet – O-связанное гликозилирование; точки протеолитического расщепления обозначены треугольниками. Серым шрифтом обозначены ферменты, участвующие в пост-трансляционном процессинге фIX и варианты искусственной модификации фIX.

Наличие домена Gla, расположенного на N-конце молекулы зрелого фIX, является общим признаком для ВКЗ белков. Этот домен обеспечивает связывание фIX и фIXа с поверхностью эндотелиальных клеток, причем данное взаимодействие полностью нарушается при блокировании γ -карбоксилирования аминокислотных остатков Asp в составе домена [117]. Первый ЭФР-подобный домен фIX содержит высокоаффинный сайт связывания иона кальция, а также обуславливает взаимодействие фIX с фактором VIIIa [118] и с тканевым фактором [93]. В составе первого ЭФР-подобного домена присутствует редко встречающийся модифицированный аминокислотный остаток β -гидроксиаспартата (Hya), возникающий при β -гидроксилировании остатка Asp64. Уровень данной пост-трансляционной модификации не влияет на прокоагуляционную активность фIX [117], но замена остатка Asp64 на остаток основной или нейтральной аминокислоты приводит к понижению активности фIX [119]. Второй ЭФР-подобный домен фIX принимает участие в образовании комплекса фIXа-фVIIIa-FX [120, 121]. Он соединяется с доменом сериновой протеазы при помощи активационного пептида и единственной дисульфидной связи.

Активационный пептид фIX содержит большую часть сайтов пост-трансляционных модификаций, влияющих на свойства фIX (Таб. 3). Домен сериновой протеазы составляет около половины общей массы фIX, содержащийся в нем активный сайт скрыт активационным пептидом и экспонируется после его отделения. Этот домен не содержит известных пост-трансляционных модификаций, после активации фIX он остается ковалентно связанным с N-концевой частью молекулы фIX при помощи одной дисульфидной связи, расположенной с обратной стороны домена (относительно области активного сайта). С-

конец фІХа также пространственно удален относительно активного сайта протеазы, что позволяет создавать слитные белки фІХ и С-концевых белков-партнеров.

Таблица 3. Пост-трансляционные модификации фІХ и его производных.

Структурный элемент	Домен	Функция	Природный фІХ	Рекомб. фІХ (нонаког альфа)	Слитный белок с Fc-фрагментом	Конъюгат с ПЭГ
γ-карбоксилирование (Glu → Gla), общее число и доля остатков Gla	Gla	Взаимодействие с мембраной клеток, связывание Ca ²⁺	всего 12 (12/12)	всего 11,6 (60% 12/12, 35% 11/12, 5% 10/12)	всего 11,2	всего 11,6 (33% 11/12; 64% 12/12)
β-гидроксилирование (Asp64 → Hya)	EGF1	н/о	37%	46% - 49%	70%	частично
N-связанные олигосахариды	AP	н/о	3-х и 4-х антенные, сиалированы Neu-5-As	Больше структур комплексного типа, выше уровень фукозилирования, больше поли-ацетилгалактозаминных структур		Обе группы присутствуют, ядро фукозилировано, 3-х и 4-х антенные комплексного типа
Гетерогенность для Asn157	AP		высокая	низкая	низкая	сиалированы <i>in vitro</i>
Сиалирование для Asn167	AP		полное	снижено	неполное	
O-связанные олигосахариды						
Ser 53	Gla	н/о	(Xyl)1-2-Glc	(Xyl)2-Glc	Отличаются от таковых для рекомбинантного фІХ из клеток CHO	Присутствует
Ser 61	Gla	н/о	NeuAcGalGlcNAcFuc	NeuAcGalGlcNAcFuc		Присутствует
Thr 159, Thr 167, Thr 172, Thr179 (?)	AP	Блокируют активный сайт протеазы	частично	частично		частично
Сульфатирование Tyr 155	AP	Уровень восстановления <i>in vivo</i>	>90%	5%-15%	4%	н/о
Фосфорилирование Ser 158	AP	Уровень восстановления <i>in vivo</i> ?	>90%	<10%	<10%	н/о
Активированный фІХ	-	Нежелательная примесь	0.21%± 0.01%	0.11± 0.0019%	<0.013%	0.03%

Примечания: н/о – не определено, домены фІХ обозначены согласно рис. 2.

Среди всех пост-трансляционных модификаций фІХ только γ-карбоксилирование в домене Gla непосредственно определяет его прокоагуляционную активность [122]. Влияние остальных модификаций на функции фІХ выражено в меньшей степени, в ряде случаев оно отсутствует или остается неизвестным.

В работах исследовательского подразделения компании Genetics Institute, Inc. было продемонстрировано, что наблюдающееся уменьшение уровня восстановления фІХ *in vivo* при инфузиях рекомбинантного белка вызвано отсутствием фосфорилирования остатка Ser158 и очень низким уровнем сульфатирования Tyr155 [112]. Инфузии препарата рекомбинантного фІХ, обогащенного сульфатированной формой, приводили к увеличенному уровню восстановления фІХ *in vivo*. Одновременно с этим, при выделении фІХ человека из плазмы крови собак с гемофилией В, получивших инъекцию рекомбинантного фІХ, наблюдалось увеличение доли сульфатированного варианта белка. Необходимо отметить, что сульфатированный остаток Tyr155 и фосфорилированный остаток Ser158 в составе активационного пептида расположены в непосредственной близости друг от друга и от олигосахаридной группы, связанной с остатком Asn157, что может привести к затруднениям при разделении фосфорилированной и сульфатированной форм фІХ. Природный фІХ подвергается как О-, так и N-гликозилированию. Сайты прикрепления О-гликанов расположены в первом ЭФР-подобном домене [123] и активационном пептиде.

Два О-связанных олигосахарида в ЭФР-подобном домене природного и рекомбинантного фІХ присутствуют полностью, 4 потенциальных сайта О-гликозилирования в активационном пептиде фІХ замещены частично в обоих случаях [124, 125]. В активационном пептиде фІХ также присутствуют два сайта N-гликозилирования – Asn157 и Asn167 [102], в случае природного фІХ оба сайта полностью заняты олигосахаридами с высоким содержанием сиаловой кислоты [126]. Энзиматическое удаление всех силовых остатков для О- и N-связанных олигосахаридных групп фІХ не изменяет скорость его активации и способность активировать фактор X [127]. В то же время, пониженный уровень сиалирования N-гликанов, выявляемый для вариантов рекомбинантного фІХ, может быть причиной изменений в связывании фІХ с поверхностью эндотелиальных клеток, скорости вывода из кровотока или чувствительности к протеолизу.

Уровень последней известной пост-трансляционной модификации фІХ - β -гидроксилирования остатка Asp64 в первом ЭФР-подобном домене, несколько увеличен в рекомбинантном фІХ относительно природного [117]. Неполная модификация Asp64 в природном фІХ указывает на отсутствие биологической значимости данной пост-трансляционной модификации для функционирования фІХ [128].

Существующий лекарственный препарат рекомбинантного фІХ не превосходит препараты природного фІХ по критериям требуемой инфузионной дозы и времени жизни в кровотоке, поэтому результаты дальнейших исследований рекомбинантных вариантов фІХ и его производных могут иметь клинические перспективы.

2.4.4. Улучшения процессов получения рекомбинантного фIX

Уровень продукции рекомбинантного фIX, приведенный для промышленной линии-продуцента в работе [129], относительно низок и составляет около 30 мг на литр культуры. Секреция фIX может быть увеличена на 30-50% при добавлении к культуральной среде тестостерона до 1 нМ [130] или увеличена вдвое при добавлении к среде активатора протеинкиназы С 4-форбол-12-мирилата-13-ацетата и кальциевого ионофора [131]. Уровень нежелательной примеси активированного фIX в кондиционированной среде может быть значительно уменьшен при понижении концентрации ионов кальция с 1.12 мМ до 0.5 мМ [132], в другой работе той же исследовательской группы сообщается о 30 % повышении уровня секретируемого фIX при увеличении концентрации ионов кальция в среде до 1.3 мМ, при этом существенного роста содержания активированного фIX не наблюдалось [133].

В исходных работах, описывающих экспрессию фIX в клетках СНО, обнаружено, что секретируемый фIX содержит значительную долю неактивных молекул с непроцессированным пропептидом. Полное или почти полное отщепление пропептида достигается только при ко-экспрессии субтилизин/кексин-подобной конвертазы PACE/furin [134] или гомологичной ей конвертазы PC5 [135].

Прокоагуляционная активность фIX зависит от уровня γ -карбоксилирования домена Gla – в полностью активном фIX первые 10 остатков Glu должны быть конвертированы в остатки Gla, при этом уровень конверсии двух последних остатков Glu не влияет на свойства фIX [136]. В молекуле природного фIX все 12 остатков Glu в домене Gla полностью γ -карбоксилированы, в то время как в рекомбинантном фIX, получаемом в клетках СНО, уровень модификации двух последних остатков Glu несколько снижен. Общее количество остатков Gla в рекомбинантном фIX из клеток СНО составляет 11.5 на одну молекулу белка; удельная прокоагуляционная активность такого фIX составляет не менее 200 МЕ/мг и не отличается от удельной активности природного фIX [129]. В случае экспрессии фIX в клетках линии ВНК для высокопродуктивных линий наблюдалось снижение удельной прокоагуляционной активности продукта, компенсировавшееся ко-экспрессией фермента витамин К 2,3-эпокси редуктазы (VKOR), обеспечивающего восстановление эпокси-формы витамина К до активной формы, используемой в качестве кофактора в реакции γ -карбоксилирования [137].

Стадия пост-трансляционных модификаций, определяющая скорость секреции фIX культивируемыми клетками, к настоящему моменту не выявлена, поэтому увеличение

уровня секреции корректно процессированного фИХ в клетках СНО возможно при оверэкспрессии или нокдауне различных ферментов и шаперонов СНО. Известно, что по крайней мере одна пост-трансляционная модификация фИХ – процессинг пропептида может производиться не на поверхности клеток, а в культуральной среде после секреции продукта при ко-экспрессии укороченного растворимого варианта PACE/furin [129]. При исследованиях скорость-определяющей стадии пост-трансляционных модификаций для гомологичного фИХ ВКЗ белка С человека, получаемого в клетках линии 293 установлено, что скорость секреции продукта лимитирована N-гликозилированием [138]. Для другого гомолога фИХ – фактора VII, получаемого в клетках СНО, скорость секреции определялась двумя стадиями пост-трансляционных модификаций – гликозилированием и γ -карбоксилированием [139].

В настоящий момент при промышленном получении рекомбинантного фИХ используются клетки линии СНО, которые могут быть заменены на более продуктивные культивируемые клетки из других тканей и организмов. Природный фИХ продуцируется клетками печени, соответственно, использование культивируемых производных гепатоцитов может дать существенное увеличение продуктивности линии. Так, при получении линий-продуцентов фИХ инфицированием одинаковым ретровирусным вектором клеток линий НерG2 (гепатома человека) и 293 (эпителий почки эмбриона человека), уровень экспрессии фИХ в клетках НерG2 был в 1.5 раза выше [131]. Применение культивируемых клеток беспозвоночных также может быть перспективным, например, уровень секреции фИХ при трансфекции линии клеток дрозофилы Sf2 был увеличен в 12 раз по сравнению с известным уровнем экспрессии фИХ в клетках СНО [140].

2.4.5. Возможности и ограничения методов получения фИХ в трансгенных организмах

Последние двадцать лет молоко трансгенных животных рассматривается в качестве перспективного источника терапевтических белков. Трансгенные овцы, содержащие гибридный ген фИХ с промоторной областью β -лактоглобулина, продуцировали небольшие количества биологически неактивного фИХ в составе молока [141]. Использование техники пересадки ядер соматических клеток, разработанной компанией ППЛ Терапьютикс Лтд, позволило несколько увеличить уровень фИХ в молоке для двух созданных трансгенных овец – Молли и Полли [142]. Примененный для их получения метод был ранее использован для создания клонированной овцы Долли. Сходные уровни продукции фИХ в молоке были зафиксированы для трансгенных коз – до 13.7 мкг/л при доле биологически активной

«гамма-гликозилированной» (термин авторов работы) формы более 90% [143] и для трансгенных мышей - 60 мг/л, 50% биологически активной формы фИХ.

Наилучшие уровни продукции фИХ были получены для трансгенных свиней [144] [145] [146]. Несмотря на теоретически предсказанные исключительно высокие уровни секреции целевых белков в свиное молоко, в случае фактора IX были достигнуты только средние уровни продуктивности (Таблица 4). Предположительной скоростью-определяющей стадией при секреции фИХ клетками молочной железы свиньи является γ -карбоксихлорирование, вследствие этого максимальная специфическая активность продукта (то есть полное γ -карбоксихлорирование фИХ) была описана для животных, продуцирующих фИХ на уровне 200 мг/л [144], в случае животных, обладающих уровнем секреции 2-3 г/л удельная активность фИХ составляла только 10-20% от нормы [145]. Несмотря на относительно низкую долю корректно γ -карбоксихлорированного фИХ, молоко высокопродуктивных трансгенных свиней использовали при разработке промышленного процесса очистки фИХ, позволяющего получать конечный продукт с высоким содержанием полностью γ -карбоксихлорированной формы и нормальным паттерном гликозилирования [146]. Предположительно, получаемый таким образом фИХ может быть использован для начала клинических испытаний. Можно отметить, что использование молока трансгенных свиней вместо кондиционированной культуральной среды из биореактора позволяет иметь исходный материал для проведения процессов выделения и очистки фИХ с увеличенным в 10 раз содержанием целевого белка. В то же время, молоко содержит во много раз больше посторонних примесей – белков свиньи и липидов, а также нестерильно и может содержать существенные количества бактерий и эндотоксинов.

В случае другого фармацевтически значимого белка – антитромбина III, обладающего сходным с фИХ набором пост-трансляционных модификаций, уровень продукции биологически активной формы целевого белка в молоке трансгенных коз был доведен до 1-2 г/л, что позволило получать конечный продукт с общим выходом 53% [147] и развернуть единственное коммерческое производство рекомбинантного антитромбина III для медицинского применения.

Уровень потребления фИХ в США может быть оценен как 2 кг/год, в России – 700 г/год, в мире – 40 кг/год. При существующих уровнях продукции фИХ в молоке трансгенных свиней и предположительном 50% выходе готового продукта при выделении и очистке, стадо из 40 свиноматок может обеспечить потребности США и стадо из 800 свиноматок может обеспечить все мировые потребности в фИХ.

Таблица 4. Основные свойства трансгенных животных, способных секретировать фИХ в молоке.

Название	Беременность, мес.	Созревание, мес.	Объем молока, л ^{*#}	Период от введения трансгена до лактации, мес.	Оценка продуктивности, г ^{*#}	Продуктивность для фИХ, по расчету, г [*]	Опубликованные уровни секреции фИХ, с поправкой на долю биологически активной формы
Мышь	0.75	1	0.0015	3-6	0.01- 0.02	0.000 045	30 мг/л [148]
Кролик	1	5-6	2-5	7-8	20	-	-
Овца	5	6-8	200-500	16-18	2500	5 – 12.5	25 мг/л, неактивен [141]
Коза	5	6-8	600-800	16-18	4000	0.008 – 0.011	0,0137 мг/л [143]
Свинья	4	6-8	200-400	15-16	1500	75 - 150	375 мг/л [145]
Корова	9	16	8000	30-33	4000-8000	-	-

*- в год на одну самку

#- по данным [149],[150]

Помимо молока трансгенных животных, перспективным источником фармацевтических белков могут быть семена и ткани трансгенных растений. В настоящий момент получение биологически активных ВКЗ белков в трансгенных растениях невозможно, поскольку растения лишены γ -карбоксилаз [151]. Это ограничение может быть преодолено ко-экспрессией в растениях генов γ -карбоксилаз млекопитающих и соответствующих коферментов, однако маловероятно, чтобы такая комплексная задача могла быть решена в ближайшем будущем.

К настоящему моменту биологически неактивный фИХ был успешно получен в трансгенных томатах [152] и семенах сои [153]. Для трансгенных томатов был зафиксирован очень низкий уровень экспрессии фИХ, 15.84 мкг/кг в свежих плодах; в случае семян сои уровень экспрессии составил 800 мг/кг. Обе системы экспрессии позволяют получать зрелый и гликозилированный целевой белок.

Небольшая часть больных гемофилией В (1.5–3%) имеет осложненную форму заболевания, характеризующуюся появлением высоких титров антител, нейтрализующих фИХ [154]. Такие антитела появляются в ответ на заместительную терапию препаратами фИХ, снижают эффективность профилактических инфузий фИХ и требуют постоянного увеличения доз фИХ или использования очень больших количеств фИХ для индукции иммунологической толерантности (ИИТ). Проведение протоколов ИИТ требует от нескольких месяцев до года и может сопровождаться развитием синдрома острой почечной недостаточности и анафилактических реакций. По крайней мере часть побочных явлений, возникающих при

проведении ИИТ, вызывается избыточной прокоагуляционной активностью вводимого пациентам фІХ, вследствие этого использование биологически неактивных вариантов фІХ могло бы увеличить безопасность проведения ИИТ. Слитный белок фІХ и субъединицы В холерного токсина (трансмукозального переносчика) был экспрессирован в хлоропластах табака на уровне 400 мг/кг листьев и, в форме порошка из замороженных листьев, применен для индукции иммунологической толерантности у нокаутных по гену фІХ мышей, получающих инъекции фІХ человека [155]. У контрольных животных, получавших порошок из замороженных листьев нетрансформированного табака, при инъекциях фІХ человека наблюдалось появление ингибиторных антител на уровне 2-90 единиц Бетесда на мл, в то время как у мышей из опытной группы концентрация ингибитора фІХ не отличалась от базового уровня. Успешное развитие иммунологической толерантности у опытных мышей также подтверждалось данными по смертности в группах – 10% мышей в опытной группе и 75% мышей в контрольной группе погибли после восьми последовательных еженедельных инъекций фІХ человека.

2.4.6. Измененные варианты рекомбинантного фІХ для клинического применения

Поскольку традиционная терапия гемофилии В была основана на применении фІХ из донорской плазмы, исходный вариант рекомбинантного фІХ для медицинского применения должен был как можно точнее воспроизводить структуру природного белка. Предполагалось, что точная копия природного фІХ человека будет обладать сравнимой клинической эффективностью и не будет вызывать иммунный ответ у проходящих терапию пациентов. В то же время, существующая заместительная терапия гемофилии В препаратами интактного фІХ требует частых внутривенных введений и больших количеств дорогостоящих лекарственных препаратов фІХ. Модификации молекулы фІХ, позволяющие увеличить удельную прокоагуляционную активность или стабильность фІХ в кровотоке, могут быть полезны для пациентов и снизить нагрузку на медицинский персонал.

Удельная прокоагуляционная активность фІХ может быть увеличена в три раза при внесении точечной замены остатка аргинина на остаток аланина Arg338Ala [156], при этом стабильность теназного комплекса остается неизменной. Замена двух аминокислотных остатков и двух коротких петель в домене сериновой протеазы фІХ на гомологичные участки последовательности фактора X позволяет получить химерный белок, обладающий высокой протеолитической активностью и типичной для фактора X субстратной специфичностью [157]. Аналогичные свойства наблюдаются у фІХ, содержащего только три замены –

Tyr94Phe, Lys98Thr и Tyr177Thr [158]. Удельная прокоагуляционная активность данных химерных вариантов фIX в тестах *in vitro* и *in vivo* остается неизученной.

Модификации фIX, позволяющие его активированной форме активировать фактора X в отсутствие природного кофактора фVIIIa могут быть использованы для терапии гемофилии А вместо препаратов фVIII. Модифицированный таким образом фIX, в отличие от фVIII, может быть использован и при ингибиторной форме гемофилии А. Введение нокаутированным по гену фVIII мышам генотерапевтической плазмиды, кодирующей мутеин фIX с тройной заменой Val181Ile, Lys265Thr, Ile383Val сопровождалось улучшением показателей свертываемости крови [159], что указывает на возможность восстановления функции гемостаза при гемофилии А без использования препаратов фVIII.

Фармакокинетические свойства фIX могут быть улучшены путем получения слитных белков фIX с долгоживущими белками плазмы крови или путем конъюгации фIX с гидрофильными полимерами. Слитные белки фIX и человеческого сывороточного альбумина (HSA) были сконструированы путем соединения С-концевой аминокислоты в молекуле фIX и N-концевой аминокислоты в молекуле зрелого HSA нерасщепляемым линкерным пептидом или линкерным пептидом, отделяемым от молекулы фIX при его активации фактором XIa [160]. Были использованы варианты неотщепляемых линкерных пептидов состава (G)₆V и SS(GGS)₆GS и варианты отщепляемого пептидного линкера, составленные из участков последовательности фIX 136-154 или 137-154, окружающих N-концевой сайт отщепления активационного пептида фIX. При активации слитных белков с неотщепляемыми линкерными пептидами домен HSA оставался прикрепленным к С-концу фIXa, а при активации слитных белков с отщепляемыми линкерными пептидами происходило образование свободной молекулы фIXa, содержащей несколько дополнительных аминокислотных остатков на С-конце молекулы, этот остаточный пептид соответствовал последним аминокислотным остаткам второго ЭФР-подобного домена фIX (Рис. 3). Специфическая прокоагуляционная активность слитного белка с отщепляемым линкером была 10-30 раз выше, чем в случае слитного белка с неотщепляемым линкером, для данного варианта также обнаружено существенное увеличение времени полувыведения из кровотока (по сравнению с интактным фIX) и достаточная эффективность при коррекции времени прекращения кровотечения у мышей с генотипом фIX(-/-).

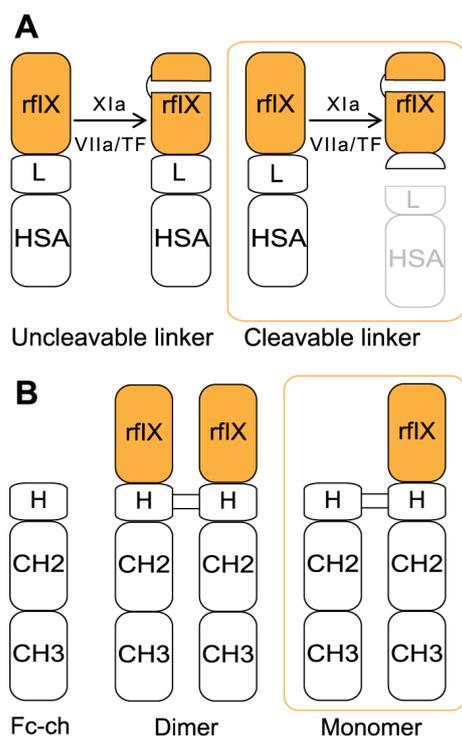


Рисунок 3. Схемы слитных белков фIX. А – слитный белок фIX и HSA, Б – слитный белок фIX и домена Fc иммуноглобулина G. Обозначения: L – линкерный пептид, H – шарнирная область тяжелой цепи IgG, CH2 и CH3 – второй и третий константные домены тяжелой цепи IgG.

Слитные белки, содержащие фрагмент Fc иммуноглобулина G могут обратимо связываться неонатальными Fc рецепторами (FcRn) – гетеродимерами β -2-микроглобулина и тяжелой цепи MHC класса I-подобного белка. Рецепторы FcRn защищают молекулы иммуноглобулинов G, содержащих домен Fc от катаболического распада путем обратимого связывания на поверхности эндотелиальных клеток [161].

Слитный белок фIX и Fc-фрагмента был получен при помощи клеточной линии НЕК-293Н и выделен как ковалентный гетеродимер фIX-Fc и свободного Fc-фрагмента (Рис. 3Б). Он обладал приемлемой удельной прокоагуляционной активностью (около 50 МЕ/мг) и продемонстрировал существенное увеличение времени полувыведения на различных животных моделях [135]. В случае низших приматов время полувыведения слитного белка из плазмы составило 47.3 ± 9.1 ч против 12.7 ч для интактного фIX. Аналогичное трехкратное увеличение периода полувыведения зафиксировано в ходе I/II фазы клинических испытаний [162].

Специфическое присоединение активированных молекул полиэтиленгликоля (ПЭГ) к N-связанным олигосахаридным группам фIX (Рис. 2) приведет к получению конъюгата, распадающегося при активации фIX на модифицированный активационный пептид и фIXа, идентичный природной молекуле. Такой тип конъюгата, содержащий 1 остаток ПЭГ длиной

40 кДа, присоединенный к N-связанному олигосахариду фIX (код N9-GP) был использован для исследований на животных моделях [163] и в клинических испытаниях в диапазоне доз 25-100 ЕД/кг, при этом период полувыведения N9-GP из плазмы пациентов составил 93 ч – в пять раз выше периода полувыведения интактного фIX [164]. Помимо этого, уровень восстановления активности фIX *in vivo* при введении N9-GP был на 94% выше уровня восстановления активности после введения немодифицированного рекомбинантного фIX. Такое различие может быть обусловлено защитой молекулы модифицированного фIX от нежелательного взаимодействия с поверхностью эндотелиальных клеток слоем ПЭГ или подавлением связывания N-гликанов фIX с молекулами на поверхности клеток. Другим объяснением обнаруженных различий уровня восстановления активности фIX может быть наличие полностью сиалированных N-гликанов в составе конъюгата N9-GP.

Пролонгация действия фIX также может достигаться различными методами инкапсуляции, обеспечивающими постепенное высвобождение белка в кровотоке. Для этого могут использоваться биоразлагаемые полимеры, липосомы и т.д., подробное описание этой области исследований выходит за рамки данного обзора. Весьма необычный метод инкапсуляции фIX был недавно применен в ходе клинических исследований [74]. Эритроциты были смешаны с раствором фIX *ex vivo*, подвергнуты осмотическому шоку, приводящему к инкапсуляции фIX, и введены обратно в кровоток больного, при этом наблюдали медленное высвобождение фIX из лизирующихся ре-инъектированных остатков эритроцитов.

2.4.7. Потенциал и границы возможностей генотерапии гемофилии В

Параллельно с развитием технологий получения рекомбинантного белка для терапии гемофилии В разрабатывались стратегии генной терапии. Заместительная терапия белковыми препаратами фIX имеет очевидные ограничения: она не приводит к излечению гемофилии, у пациентов на протяжении всей жизни сохраняется риск кровотечений и хронического повреждения суставов. Среди других общих недостатков заместительной терапии - нехватка препаратов, высокая стоимость лечения, короткое время полужизни фактора IX и риск возникновения нейтрализующих антител (ингибиторов) к вводимому белку фIX.

Обе формы гемофилии (А и В) являются особенно хорошими мишенями для генной терапии, поскольку вызваны известными одиночными дефектами генов, а кроме того имеют широкое терапевтическое окно – 1% от нормального уровня фIX в плазме может

предотвратить большинство рисков геморрагий, вместе с тем и увеличение концентрации фIX до 150% также не приводит к побочным эффектам.

В случае генной терапии терапевтический уровень фIX обычно определяется как 5-10% от нормального уровня фIX в плазме, так как в этом случае можно избежать инъекций белка фIX. Экспрессия фIX на уровне ниже терапевтического в ряде случаев достаточна для индукции иммунной толерантности у пациентов, страдающих от ингибиторной формы заболевания.

На модельных животных показана возможность невирусной доставки гена фIX *in vivo* при помощи «голой» плазмидной ДНК. Одной гидродинамической инъекции экспрессионной плазмиды, содержащей кДНК фIX и гепатоцитарную регуляторную область, было достаточно для поддержания терапевтического уровня фIX в фIX-дефицитных мышцах в течение 210 дней [165]. Процедура гидродинамической инъекции в данной работе сводилась к введению 50 мкг плазмиды в 2 мл раствора на протяжении 5-8 с в хвостовую вену. Такой метод введения не может быть применен в клинической практике. Клинические испытания, включающие доставку плазмид методом «гидродинамических инъекций» станут возможными только после изобретения существенных модификаций метода.

Доставка целевого гена в клетки организма может производиться с куда большей эффективностью при использовании вирусных векторов – либо на основе интегрирующихся в геном клетки-хозяина ретровирусов (RV) или лентивирусов (LV) либо преимущественно эписомально персистирующих аденовирусов (AV) или адено-ассоциированных вирусов (AAV).

Первые векторные системы для генетической терапии базировались на ретровирусах. RV частицы, содержащие кДНК фIX, были использованы для *ex vivo* трансдукции фибробластов модельных животных с последующей реимплантацией модифицированных клеток, что приводило к появлению детектируемых количеств фIX человека в плазме крови опытных животных [166]. Экспрессия фактора IX наблюдалась лишь у небольшого процента животных с имплантированными трансдуцированными фибробластами, однако наблюдаемый эффект в опытах с кроликами был стабилен на протяжении более чем 600 дней [167]. Была проведена I фаза клинических испытаний метода терапии гемофилии В, состоящего в реимплантации аутологических фибробластов кожи, трансдуцированных *ex vivo* γ -ретровирусным вектором, кодирующим фIX [168], в ходе которой наблюдалось транзиторное умеренное увеличение уровня фIX в плазме крови у двоих участвовавших в исследовании пациентов.

Лентивирусные векторы, в отличие от γ -ретровирусных, способны трансдуцировать гепатоциты взрослого организма *in vivo*. После внутривенного введения LV половозрелым мышам, нокаутным по гену фIX, в плазме транзитно достигались терапевтические уровни фIX [169]. Известно, что LV способны эффективно трансдуцировать антиген презентующие клетки (АПК) в селезенке, что может приводить к развитию иммунной реакции против трансгенного целевого белка в системной циркуляции [170]. Это нежелательное свойство LV можно подавить при помощи ограничения экспрессии трансгена в различных типах клеток при использовании тканеспецифических промоторов или ко-экспрессии микроРНК, тканеспецифично подавляющих экспрессию трансгена. Индукция стабильной экспрессии фIX, локализованной в гепатоцитах мышей путем использования гепатоцит-специфической промоторной области и микроРНК гематопоэтических клеток miR-142-3p привела к долговременному (280 дней) повышению уровня фIX до 10% от нормы для мышей с моделью гемофилии В [171]. Все животные выжили после испытания отсечением хвоста, ни у одного из них не наблюдалось появления антител к фIX.

Экспрессия фIX может быть также ограничена гематопоэтическими клетками для обеспечения лучшего доступа целевого белка к местам его действия. Обнадешивающие результаты получены на мышинной модели гемофилии В для лентивирусных конструкций с промотором интегрин альфа-IIb, избирательно экспрессировавшихся в мегакариоцитах - фIX накапливался в альфа-гранулах тромбоцитов и высвобождался после их активации [172], фенотипическая коррекция гемофилии В была подтверждена 100% выживаемостью после отсечения хвоста.

Общим ограничением при использовании векторов на основе интегрирующихся вирусов, в том числе RV и LV, являются риски инсерционного мутагенеза и активации онкогенов при интеграции вектора [170], поэтому эписомально реплицирующиеся векторы, кодирующие фIX, потенциально более безопасны для пациентов и привлекают большее внимание исследователей. Аденовирусные векторы высокой емкости (HCAV), способные к долговременной эписомальной репликации и не кодирующие белки вируса, обычно вызывают сильно уменьшенный иммунный ответ. Применение тканеспецифических промоторов для ограничения числа типов клеток, экспрессирующих целевой ген, может еще больше уменьшить иммунный ответ, что потенциально позволяет продлить период активной экспрессии трансдуцированного целевого гена [173]. HCAV со специфичным для клеток печени промотором позволил получить терапевтически значимый уровень экспрессии IX на животных моделях гемофилии В у мышей [174] и собак [175, 176] при низком уровне острой токсичности вектора, однако во всех случаях экспрессия трансгена со временем постепенно

снижалась. При введении высоких доз данного вектора у животных наблюдалось возникновение ингибиторных антител к фIX, гематологическая и печеночная токсичность [176], что ограничивало период экспрессии трансгена у собак 446-604 днями.

Непатогенные, неспособные к самостоятельной репликации и интегрирующиеся в геном с низкой вероятностью векторы на основе адено-ассоциированных вирусов (AAV) являются перспективными средствами доставки для генов, не превышающих по длине 4.7 т.п.н. [177]. Для генотерапевтических частиц AAV был разработан процесс производства, соответствующий правилам надлежащей производственной практики (GMP) [178]. Как правило, AAV-векторы вводят при помощи внутримышечной инъекции или инфузии в портальную вену; такие способы введения обеспечивают преимущественную трансдукцию клеток скелетной мускулатуры или гепатоцитов.

При внутримышечной инъекции адено-ассоциированных вирусных частиц AAV2-FIX собакам с гемофилией В, вызванной миссенс мутацией, достигалась долговременная экспрессия фIX [179]. Установлено, что развитие ингибиторных антител зависит от природы дефекта гена фIX – у собак с миссенс мутацией ингибиторные антитела не возникали [179], тогда как у собак с нонсенс мутацией или нестабильной мРНК фIX наблюдался их значительный уровень [180], также наблюдалась положительная корреляция между частотой возникновения иммунного ответа и дозой введенного вектора [181]. Вследствие этого для клинических испытаний AAV2-FIX, вводимого путем внутримышечных инъекций, привлекали пациентов с выявленными миссенс мутациями гена *FIX* и использовали низкую дозу AAV2-FIX для каждого места инъекции [182-184]. Такой вид терапии был безопасен для пациентов, однако полученные уровни экспрессии фIX не достигали терапевтически значимых величин.

Долговременная экспрессия фIX, не сопровождающаяся возникновением ингибиторных антител, получена для здоровых мышей и мышей с моделью гемофилии В, а также для собак с моделью гемофилии В и низших приматов при применении более инвазивной процедуры - направленного введения AAV частиц в печень [177, 185-189]. При доставке AAV2-FIX в печень собак с моделью гемофилии В, вызванной нулевой мутацией (при которой наблюдается частое появление ингибиторных антител к фIX) достигалась долговременная коррекция проявлений гемофилии (8 лет наблюдения) и не выявлялись ингибиторные антитела [190].

Для процедуры внутривенной инфузии векторов на основе AAV2, кодирующих фIX под контролем гепатоспецифического промотора, были проведены клинические испытания I фазы [191]. Уровень экспрессии трансдуцированного фIX достигал 10% от

физиологической нормы, однако период экспрессии трансгена не превышал 6 недель, что, вероятно, объясняется развитием иммунной реакции на компоненты вирусного капсида. Предполагается, что быстрая элиминация трансдуцированных вирусов являлась следствием наличия у пациентов иммунитета к AAV2 вирусам дикого типа, довольно распространенным в популяции [191, 192].

Другие серотипы AAV, а именно AAV8 и AAV9, оба имеющие тропизм к печени и менее распространенные в человеческой популяции [193] были проверены на модельных животных. AAV8 оказался более эффективным носителем гена IX, чем AAV2, в случае модельных мышей и собак [194], [195] и продемонстрировал долгосрочную (до 5 лет), безопасность и эффективность при введении негуманоидным приматам [196], в последнем случае терапевтически значимый уровень трансдуцированного фIX сохранялся постоянным для животных из группы с оптимальной дозой введенного вектора. Для AAV8-фIX, доставляемого к печени инфузией через периферические вены, были проведены клинические испытания фазы I. Ожидаемые иммунные реакции пациентов были подавлены проведением курсовой терапии уменьшающимися дозами преднизолона (несколько недель) и для шести пациентов были достигнуты стабильные уровни экспрессии фIX от 1% до 8% от физиологической нормы [197]. Для четырех пациентов заместительная терапия фIX была прекращена, для двоих – значительно сокращена.

Несмотря на многочисленные усилия исследователей, основой терапии гемофилии В продолжает оставаться заместительная терапия препаратами рекомбинантного или полученного из донорской плазмы фактора IX. Модификация молекулы фIX при помощи добавления к фIX слитых с ним в рамке доменов белков или конъюгация фIX с ПЭГ может снизить частоту введения препаратов, но, скорее всего, не изменят стоимость и общую безопасность заместительной терапии. Генотерапия гемофилии В, проводимая при помощи вирусных векторов с кДНК фIX, весьма перспективна для значительной части больных. Предположительно, большинство больных гемофилией В смогут сократить частоту и интенсивность заместительной терапии препаратами фIX и некоторая часть больных сможет полностью отказаться от инъекций фIX. Можно ожидать, что простое увеличение объема производства рекомбинантного фIX, реализованное как выпуск в обращение биосимилярных препаратов, получаемых при помощи все более продуктивных клеточных линий и трансгенных животных, существенно улучшит качество жизни больных гемофилией В в мире в ближайшие годы.

2.4.8. Возможные пути повышения продуктивности систем экспрессии фІХ в клетках СНО

Из всех посттрансляционных модификаций только γ -карбоксилирование в домене Gla непосредственно определяет прокоагуляционную активность фІХ. Тем не менее рекомбинантный фІХ, полученный в клетках СНО, имеет одно существенное отличие от природного фІХ в качестве лекарственного средства – уровень восстановления прокоагуляционной активности фІХ *in vivo* у пациентов при инфузии препаратов фІХ в среднем в 1,29 раза ниже для рекомбинантного фІХ, чем для природного концентрата фІХ человека [198]. Причины, вызывающие меньшее восстановление прокоагуляционной активности для рекомбинантного фІХ, остаются неясными, поскольку сравнительные клинические исследования фармакокинетики препаратов фІХ показывают несколько больший период полувыведения для рекомбинантного фІХ: 36 ч для рекомбинантного фІХ против 32.7 ч для природного фІХ в исследовании [199]. Возможной причиной пониженного восстановления активности рекомбинантного фІХ *in vivo* могут являться отсутствие сульфатирования Туг158 и/или фосфорилирования Ser158 в составе активационного пептида, однако доказательства в пользу этой гипотезы были получены только для животных моделей гемофилии В [112].

Во многих описанных случаях продуктивность систем гетерологической экспрессии гена фІХ человека определялась не уровнем биосинтеза собственно фІХ, а возможностями клетки-хозяина по его корректной пост-трансляционной модификации. В частности, при экспрессии гена фІХ в клетках СНО при практически любом уровне удельной продуктивности обнаруживалось, что значительная доля секретируемого фІХ неактивна, так как содержит непротрипированный пропептид, полностью блокирующий функционирование Gla-домена. Восстановление нормального процессинга пропептида фІХ возможно при ко-экспрессии субтилизин/кексин-подобной конвертазы PACE/furin или гомологичной ей конвертазы PC5. Наилучший уровень удаления пропептида у секретируемого фІХ может быть достигнут при ко-экспрессии укороченного варианта PACE/furin человека, также секретируемого в культуральную среду, таким образом, удаление пропептида может происходить не только в аппарате Гольджи, но и во внеклеточном пространстве [200].

Активность фІХ также определяется уровнем γ -карбоксилирования остатков Glu в Gla-домене. В полностью активном фІХ первые 10 остатков Glu из 12 должны быть конвертированы в остатки Gla. В молекуле природного фІХ все 12 остатков Glu в Gla-домене полностью γ -карбоксилированы, в препаратах рекомбинантного фІХ уровень модификации двух последних остатков снижен, что не влияет на свойства фІХ. Следует отметить, что

стандартный метод очистки рекомбинантного фIX при помощи анионообменной хроматографии с элюцией раствором CaCl_2 при низкой ионной силе позволяет эффективно удалять молекулы фIX с нефункциональным Gla-доменом, поэтому недостаточный уровень γ -карбоксилирования фIX влияет скорее на выход готового продукта, чем на удельную прокоагуляционную активность очищенного фIX. Общее число остатков Gla в очищенном рекомбинантном фIX из клеток CHO достигает 11,5 на одну молекулу белка, а удельная прокоагуляционная активность составляет не менее 200 МЕ/мг, что не отличается от удельной активности природного белка.

Реакцию γ -карбоксилирования остатков Glu в молекулах витамин K-зависимых белков осуществляет фермент витамин K-зависимая γ -глутамин карбоксилаза (GGCX, EC 4.1.1.90) [201], реакция происходит в просвете эндоплазматического ретикулума и предшествует транслокации про-белков в аппарат Гольджи. В качестве источника присоединяемой карбоксильной группы выступает растворенный углекислый газ, а донором электронов и кофактором GGСХ является восстановленная дигидрохиноновая форма витамина K (KH_2), превращающаяся при прохождении реакции в 2,3-эпоксид хинона ($\text{K}>\text{O}$). Реакция γ -карбоксилирования требует постоянного поддержания существенной концентрации KH_2 в просвете эндоплазматического ретикулума. Восстановление $\text{K}>\text{O}$ до KH_2 в клетках позвоночных производится ферментным комплексом VKOR или VKORC (vitamin K oxireductase complex), основным компонентом которого является интегральный белок - субъединица 1 комплекса 2,3-эпоксиредуктазы витамина K (VKORC1, EC 1.1.4.1) [202].

При попытках оверэкспрессии в клетках CHO гена фактора свертывания крови VII человека (FVII), витамин K-зависимого белка, Gla-домен которого функционален только при полном γ -карбоксилировании всех 12 остатков Glu установлено, что доля функционально активных молекул FVII очень низка и оверэкспрессия GGСХ не приводит к повышению удельной активности FVII. Одновременно с этим, оверэкспрессия гена FVII в клетках линий НерG2 и ВНК позволяет получать преимущественно функционально активный белок. Причиной этих различий в способности клеток разных линий обеспечивать прохождение реакции γ -карбоксилирования является различный уровень активности комплекса VKOR. Оверэкспрессия гена VKORC1 человека в клетках линии CHO позволяет получить функционально активный продукт и существенно повысить скорость секреции клетками фактора VII [139].

Сходные данные были получены для фIX, секретируемого клетками линии ВНК [137]. Для описанных в литературе систем экспрессии фактора IX в клетках CHO, лимитированных

уровнем процессинга пропептида целевого белка, уровень гамма-карбоксилирования, обеспечиваемый эндогенным ферментом VKORC1, оставался достаточным для получения фактора IX с полной функциональной активностью [200]. Тем не менее при существенном увеличении уровня экспрессии гена фIX степень γ -карбоксилирования остатков Glu в Gla-домене может существенно упасть, на что указывает обнаруженные в работе [131] сильные различия в уровне секреции фIX клетками линии HepG2 (трансформированные гепатоциты) по сравнению с линиями клеток, полученных из других тканей. Клетки HepG2 обладают высокой активностью VKORC1 и, соответственно, секретируют фIX более эффективно.

Обычным способом увеличения витамин К-оксидоредуктазной активности в культивируемых клетках является их трансфекция плазмидой, кодирующей известный ген VKORC1 человека, однако его относительная каталитическая эффективность в клетках других видов млекопитающих неочевидна. Ортологи VKORC1 разных видов млекопитающих не полностью гомологичны друг другу и их каталитическая эффективность *in vitro* различается примерно в 4 раза [203]. В настоящий момент белковый состав комплекса VKOR не установлен, наиболее вероятным источником электронов для работы фермента VKORC1 считают тиоредоксин-подобные белки эндоплазматического люмена, в том числе TMX [204], при этом мембранная топология VKORC1 установлена только по аналогии с бактериальным белком-аналогом из *Synechococcus sp.* и, соответственно, пространственная цепь переноса электронов к цистеинам активного центра VKORC1 пока не описана, в отличие от его гомолога VKORC1L1 [205].

Мы предположили, что наблюдаемая низкая активность комплекса VKOR в клетках линии CHO может быть вызвана не низкой каталитической эффективностью собственного VKORC1 китайского хомячка, а только лишь его недостаточным уровнем экспрессии. Таким образом, требуемый максимальный уровень секреции фIX человека в клетках CHO может быть обеспечен путем ко-экспрессии целевого гена, растворимого варианта PACE/furin человека и VKORC1 китайского хомячка, при этом необходимый уровень экспрессии вспомогательных генов может быть определен при отборе клональных линий клеток-продуцентов по доле прокоагулянтно активных молекул фIX с удаленным пропептидом.

2.5. Фолликулостимулирующий гормон человека

Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) - гормон гипофиза, относящийся совместно с лютеинизирующим гормоном (ЛГ), к гонадотропинам, или гонадотропным гормонам. ФСГ представляет собой гликопротеин с молекулярной массой около 30 кДа, состоящий из α - и β -субъединиц, α -субъединица ФСГ (14,2 кДа) содержит 92 аминокислоты и 5 внутримолекулярных дисульфидных связей и одинакова для всех гликопротеидных гормонов (ФСГ, лютеинизирующий гормон (ЛГ), тиреотропин (ТТГ) и хорионический гонадотропин (ХГ)) [206]. Бета-субъединица ФСГ с молекулярной массой 17 кДа содержит 111 аминокислотных остатков и 6 внутримолекулярных дисульфидных связей. Она индивидуальна для каждого гликопротеидного гормона, и определяет его биологические свойства. Можно сказать, что альфа-субъединица гликопротеидных гормонов представляет собой общий белок-шаперон, обеспечивающий необходимое время полужизни бета-субъединиц в системной циркуляции. Около 30% общей молекулярной массы ФСГ составляют углеводные остатки. Обе субъединицы ФСГ имеют по 2 сайта N-гликозилирования, в природном ФСГ они полностью заняты олигосахаридными группами. [207]. Углеводные компоненты ФСГ представляют собой в основном включают галактозу, маннозу, N-ацетилглюкозамин, фукозу, сиаловую кислоту, точки гликозилирования показаны на Рис. 4. Период полураспада гонадотропинов, циркулирующих в крови, имеет прямое отношение к компоненту сиаловых кислот в молекуле гормона. Известно, что десиамирование существенно укорачивает период полураспада и, как следствие, биологическую активность *in vivo*.

Считается, что углеводный компонент α -субъединицы ответственен за поддержание гетеродимерной структуры, а также секрецию гомона и взаимодействие гетеродимера с рецептором, в то время как углеводный компонент β -субъединицы определяет клиренс в кровотоке [208, 209]. Таким образом, негликозилированный ФСГ не может проявлять никакой биологической активности *in vivo* и, вследствие этого, рекомбинантный ФСГ для клинического применения может быть получен только при помощи культивируемых клеток млекопитающих, например, CHO [210]. Получение ФСГ с использованием трансгенных животных затруднено вследствие токсичности повышения уровня ФСГ в системной циркуляции животного. Профиль гликозилирования может при этом отличаться от профиля нативного гормона, что не оказывает негативного влияния на клиническую эффективность рекомбинантного ФСГ. Необходимо также отметить, что «нативный» ФСГ, используемый в клинической практике, получают из мочи менопаузальных женщин, и его изогормональный

профиль, то есть распределение олигосахаридов, содержащих отрицательно заряженные остатки сиаловых кислот, сильно отличается от изогормонального профиля ФСГ, циркулирующего в кровотоке [211]. ФСГ из мочи содержит в основном низкоактивные и долгоживущие кислые формы гормона, вследствие этого рекомбинантный ФСГ, содержащий смесь нейтральных и кислых форм [212], лучше соответствует тому эндогенному ФСГ, который циркулирует в кровотоке [208, 213].

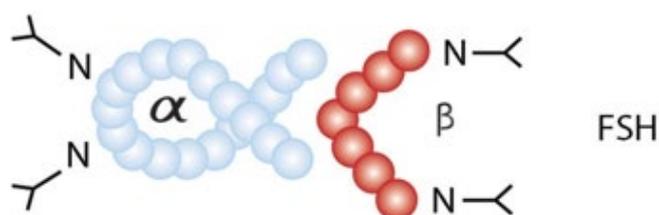


Рисунок 4. Схема гликозилирования ФСГ. Альфа-субъединицы всех гликопротеидных гормонов идентичны и содержат два сайта N-гликозилирования. Бета-субъединица ФСГ содержит два сайта N-гликозилирования.

По существующим данным рентгеноструктурного анализа [214] (Рис. 5), β -субъединица димера локализована преимущественно внутри его молекулы и покрыта сверху α -цепью. Последняя защищает β -цепь от действия протеаз и тем самым стабилизирует ее в процессе транспортировки от эндокринных желез к местам действия. По-видимому, специфическое сродство гормонов к соответствующим рецепторам определяется β -субъединицей, причем прежде всего отличающимися участками ее пептидной цепи.

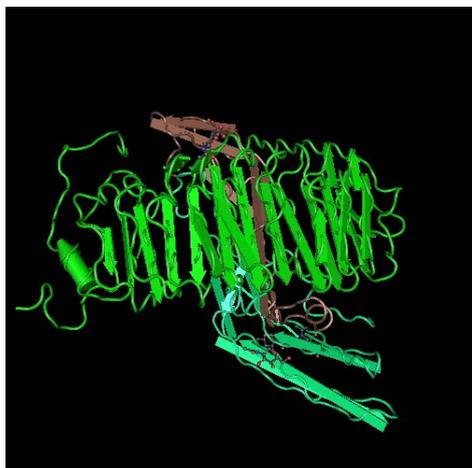


Рисунок 5. Структура ФСГ в комплексе с эктодоменом его рецептора (по [214]). α -субъединица – коричневый цвет, β -субъединица – зеленый цвет, ФСГ-рецептор – светло-зеленый цвет.

2.5.1. Биосинтез, секреция и транспорт ФСГ

ФСГ *in vivo* синтезируется исключительно в базофилах передней доли гипофиза. Исходно гормон образуется не в биологически активной форме, а в виде более крупной неактивной молекулы, так называемой препроформы гормона. Помимо аминокислотной

последовательности самого гормона в этой молекуле содержится ряд дополнительных остатков, которые ферментативно отщепляются на этапе пост-трансляционного процессинга в ЭПР. После фолдинга, установления дисульфидных связей и переноса на белок олигоманнозного кора, проформа поступает в комплекс Гольджи, где происходит окончательная пост-трансляционная модификация, гетеродимеризация и упаковка гормона в секреторные везикулы.

Образование и освобождение как ФСГ, так и ЛГ стимулируется гипоталамическим декапептидом - гонадотропин-рилизинг-гормоном, секреция которого происходит эпизодически, что в основном и определяет импульсный характер секреции ЛГ и ФСГ.

У женщин эстрогены и прогестерон по механизму обратной связи влияют на секрецию ЛГ и ФСГ как на гипоталамическом, так и на гипофизарном уровне. ФСГ выделяется гипофизом в сеть венозных капилляров, окружающих железу. После прохождения легких и сердца гормоны попадают в большой круг кровообращения и разносятся по всему телу. Благодаря своему химическому составу белково-пептидные гормоны являются гидрофильными и легко растворяются в плазме крови. $T_{1/2}$ ФСГ составляет примерно 150 мин.

2.5.2. Роль олигосахаридных групп в функционировании ФСГ

Субъединицы всех гликопротеидных гормонов содержат различные *Asn*-связанные (N-связанные) олигосахаридные остатки с различной степенью сульфатирования и сиалирования (Рис. 6), что определяет большое разнообразие изогормонов ФСГ как по общему заряду, так и по его распределению внутри молекул (бимолекулярных комплексов) ФСГ. Первичная последовательность ФСГ включает в себя по 2 сайта гликозилирования на каждую субъединицу: N52 и N78 для α -субъединицы и N4 и N24 для β -субъединицы. Процесс гликозилирования начинается в ЭПР ко-трансляционным переносом прекурсора $Glc_3Man_9GlcNAc_2$, связанного с липидом долихолом с помощью пирофосфатного мостика, на остатки *Asn* в последовательностях *Asn-X-Ser* или *Asn-X-Thr*, где X – любая аминокислота, за исключением пролина. Все гликопротеидные гормоны обладают, таким образом, общим кором, состоящим из двух остатков N-ацетилглюкозамина и трех остатков маннозы [215]. После формирования димера и отщепления остатков глюкозы и маннозы до остатка состава $Man_5GlcNAc_2$ в ЭПР и цис-отделе аппарата Гольджи, дальнейший процессинг олигосахаридов, связанных с белком, осуществляется в среднем и транс-отделах аппарата Гольджи. Большая часть N-связанных олигосахаридов в человеческом ФСГ представляет

собой моно-, ди- и трисиалированные биантенные структуры, что придает молекуле общий отрицательный заряд. В отличие от ЛГ, который в основном подвергается терминальному сульфатированию, лишь 5-7% олигосахаридов в ФСГ содержат сульфатные остатки.

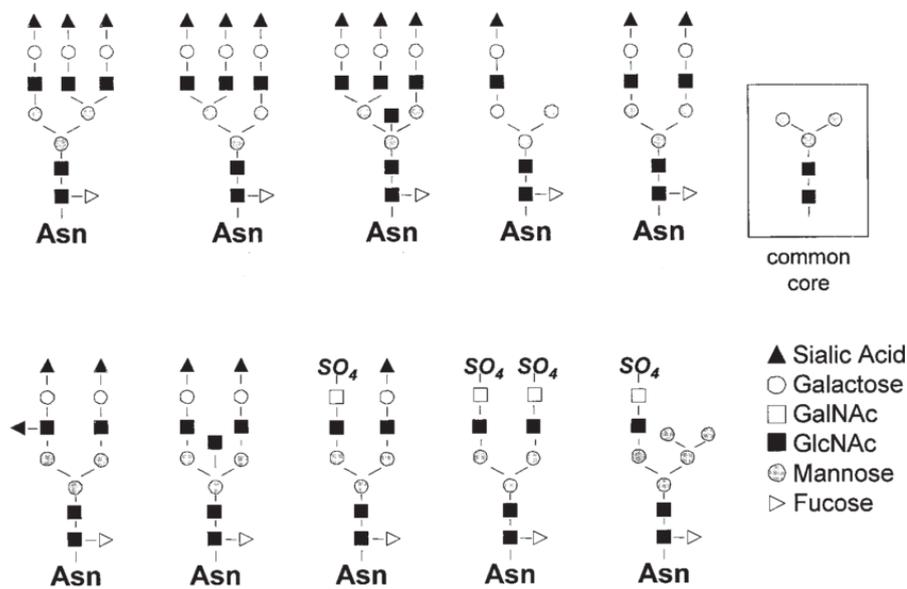


Рисунок 6. Некоторые N-связанные олигосахаридные структуры, представленные в бычьем и человеческом ФСГ, цит. по [216]. Также были обнаружены многие другие гликаны (не представлены на схеме), не до конца подвергшиеся процессингу (отсутствие терминальных остатков сульфата, фукозы и сialовой кислоты).

Соотношение терминальных остатков сialовой кислоты и галактозы играет важную роль в продолжительности циркулирования гормона в кровотоке [217]. Наличие остатков галактозы значительно увеличивают скорость клиренса из плазмы через механизм, опосредованный печеночными рецепторами к асиалогликопротеинам. Как следствие, высокосиалированные формы меньше захватываются такими рецепторами и циркулируют в кровотоке дольше, чем низкосиалированные. И наоборот, присутствие терминальных остатков N-ацетилгалактозамин-4-сульфата, N-ацетилглюкозамина или маннозы ускоряет клиренс молекулы посредством специфических рецепторов печеночного эндотелия и клетками Купфера [218]. ФСГ и другие гликопротеидные гормоны также подвергаются деградации в почках, однако на сегодня неизвестно, в какой степени почечный клиренс определяется структурой гликанов. Доказано, что повышение доли низкосиалированных форм, синтезируемых гипофизом в предовуляторную фазу, коррелирует с уменьшением времени полужизни ФСГ в плазме в это время цикла [219].

2.5.3. Рецептор ФСГ, общая схема передачи сигнала

ФСГ оказывает физиологические эффекты посредством связывания со своим рецептором на поверхности клеток гранулезы в яичниках и на поверхностях клеток Сертоли в семенниках. Рецептор ФСГ (ФСГР) относится к трансмембранным рецепторам, сопряженными с G-белками (Рис. 7). Свободная α -субъединица G-белка рецептора ФСГ активирует аденилатциклазу, что приводит к образованию циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), цАМФ активирует, в свою очередь, протеинкиназу А путем отщепления регуляторной субъединицы от каталитической. Активный каталитический сайт протеинкиназы А активирует путем фосфорилирования различные ферменты, структурные белки и факторы транскрипции, в частности, *CREB* (*cAMP responsive elements binding proteins*) и *CREM* (*cAMP responsive elements modulators*), которые связываются с промоторными областями различных генов, содержащих *CRE*-сайт. В конечном итоге перечисленные события вызывают усиление транскрипции и повышение продукции стероидных половых гормонов, необходимых для роста фолликулов и овуляции у женщин.

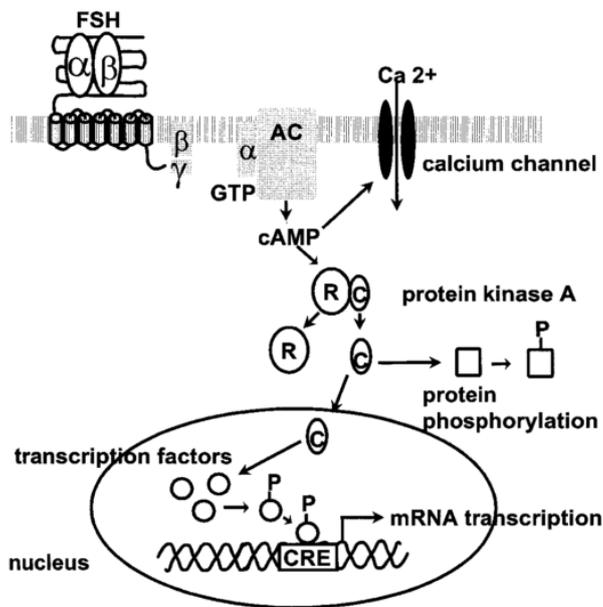


Рисунок 7. Путь проведения сигнала рецептором ФСГ, сопряженного с G-белком.

2.5.4. Биологические функции ФСГ

ФСГ оказывает физиологические эффекты посредством связывания со своим рецептором на поверхности клеток гранулезы в яичниках и на поверхностях клеток Сертоли в семенниках. Рецептор ФСГ относится к трансмембранным рецепторам, сопряженными с G-белками [220]. Основной целью ФСГ у самцов (мужчин, в случае *H.sapiens*) являются клетки Сертоли, найденные в канальцах семенника. Они заякоривают и питают сперматиды,

которые впоследствии превращаются в сперматозоиды в процессе сперматогенеза. Основной физиологический эффект фолликулостимулирующего гормона у мужчин, таким образом, - продукция клеток спермы.

У самок (женщин, в случае *H.sapiens*) ФСГ в основном воздействует на клетки гранулёзы фолликула яичника. ФСГ является митогеном для этих клеток, то приводит к общему фолликулярному росту и развитию. ФСГ также запускает ферментативное производство гликозаминогликанов (являются важным компонентом фолликулярной жидкости), ароматазы и других ферментов, участвующих в цикле синтеза эстрогенов.

Под действием ФСГ созревающие фолликулы секретируют всё возрастающие количества эстрогенов, в первую очередь эстрадиола, а также увеличивают количество рецепторов ЛГ. В результате к моменту созревания фолликула повышение уровня эстрадиола становится достаточным для прямой активации гипоталамуса по принципу положительной обратной связи и интенсивному высвобождению ЛГ и ФСГ гипофизом. Этот всплеск уровня ЛГ запускает овуляцию, при этом не только высвобождается яйцеклетка, но и инициируется процесс лютеинизации — превращения остаточного фолликула в жёлтое тело, которое в свою очередь начинает вырабатывать прогестерон для подготовки эндометрия к возможной имплантации. ЛГ необходим для поддержания существования жёлтого тела примерно в течение 14 дней. В случае наступления беременности лютеиновая функция будет поддерживаться действием гормона трофобласта — хорионического гонадотропина. Влияние ФСГ на развитие фолликула и состояние эндометрия матки показано на (Рис. 8).

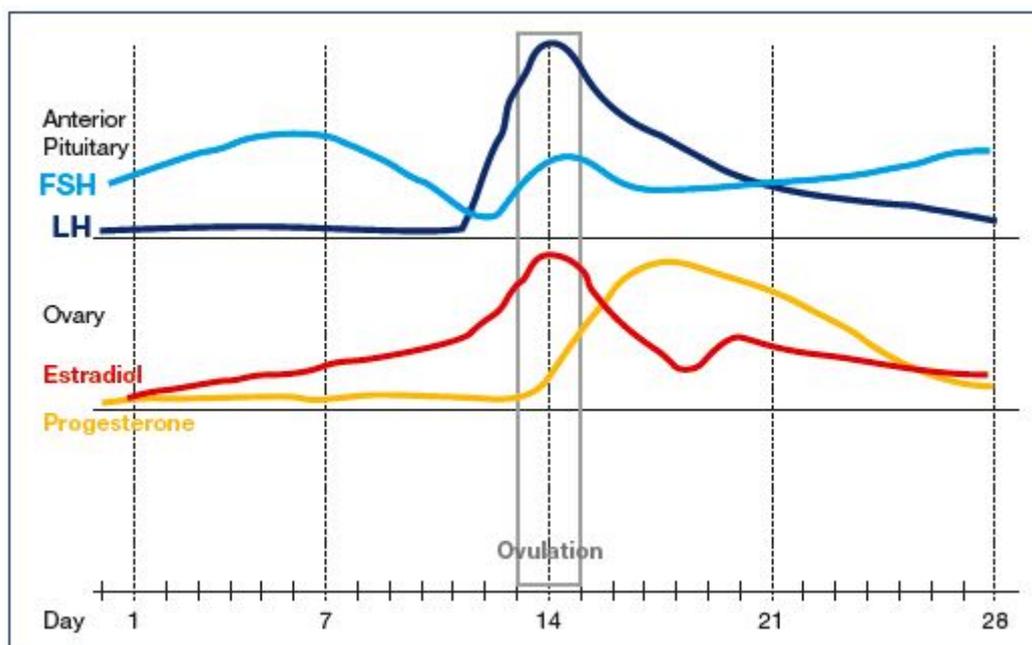


Рисунок 8. Соотношение овариального и маточного циклов с уровнем половых гормонов для самок плацентарных млекопитающих, приведено по [221].

2.5.5. Рекombинантный ФСГ для клинического применения

До развития рекомбинантных технологий единственным источником получения ФСГ была моча женщин в постменопаузе (типичный препарат *Metrodin®*, МНН: урофоллитропин). Однако такой гормон не может быть очищен в достаточной степени и содержит некоторые количества ЛГ, кроме того, сохраняется опасность перенесения инфекционных агентов и ко-экстракции лекарственных средств из мочи. На настоящий момент практически все используемые в клинической практике лекарственные препараты рекомбинантных гонадотропинов были получены при помощи клеток СНО, трансфицированных плазмидой или парой плазмид, содержащих гены α - и β -цепей под контролем сильных промоторов, действующих в клетках млекопитающих, обычно — немедленным ранним промотором цитомегаловируса. В настоящее время имеется два оригинальных лекарственных средства рекомбинантного ФСГ: фоллитропин-альфа и фоллитропин-бета. Воспроизведенные варианты ФСГ обычно проходят регистрацию под этими МНН по результатам сравнительных клинических исследований, в которых препаратами сравнения выступает один из двух оригинальных препаратов ФСГ. Недавние мета-исследования показали небольшое, но статистически значимое различие препаратов фоллитропина альфа и бета при применении в клинической практике: фоллитропин бета

вызывал более низкую частоту наступления беременности, но с более высоким уровнем эстрадиола [222].

Первым рекомбинантным препаратом ФСГ на рынке стал фоллитропин альфа (торговое название Gonal-F®). Он обладает аминокислотным составом, идентичным нативному человеческому ФСГ, не вызывает появления значимых количеств анти-ФСГ и анти-СНО-антител. Исследования фоллитропина альфа показали, что качественный состав олигосахаридов в целом идентичен в рекомбинантном и гипофизарном ФСГ [208]. Методом анионообменной ВЭЖХ в составе N-связанных олигосахаридов ФСГ были обнаружены остатки маннозы, фукозы, N-ацетилглюкозамина, галактозы и сиаловой кислоты. Однако *MALDI-TOF-MS* анализ показал, что олигосахариды рекомбинантного фоллитропин альфа менее гетерогенны по составу и содержат меньше высокосиалированных форм. Предполагается, что такое различие структуры вызвано тем фактом, что рекомбинантный гормон синтезируется одной клеточной линией, в то время как источником человеческого ФСГ является большой пул доноров. Преобладание высокосиалированных форм в ФСГ, выделенном из мочи, по-видимому отражает процесс селекции более стабильных и долгоживущих форм, поскольку молекула проходит кровоток и мочевую систему. Несмотря на некоторые вариации в составе, рекомбинантный и нативный препараты показали сходную биологическую активность *in vivo* и *in vitro*. Более того, в клинических исследованиях рекомбинантный ФСГ проявил большую эффективность при стимуляции роста фолликулов.

Препараты рекомбинантного ФСГ представляют собой лиофилизаты для приготовления растворов для инъекций или предзаполненные шприцы-ручки с картриджами, реже – однодозовые стеклянные предзаполненные шприцы.

2.5.6. Продуктивность существующих систем биосинтеза ФСГ и возможности по ее увеличению

Большинство описанных в литературе клеточных линий, секретирующих ФСГ, обладают удельной продуктивностью около 0,5-1,5 пг/клетка/день [223, 224]. В некоторых случаях клеточные линии, секретирующие ФСГ с удельной продуктивностью на уровне 0,0085 мМЕ/клетка/48 ч, что соответствует 0,32 пг/клетка/день, объявляются как источники “highly expressed” ФСГ [225].

Можно предположить, что сообщаемые низкие удельные продуктивности клеточных линий, секретирующих ФСГ человека, вызваны не токсичностью продукта для клеток-хозяев или его распадом в клетке или среде после секреции, а всего лишь отсутствием баланса в уровне экспрессии генов субъединиц ФСГ. Существует несколько общих способов

проведения координированной ко-экспрессии пары генов, кодирующих субъединицы гетеродимерного белка. В простейшем случае клетки трансфицируют парой плазмид, каждая из которых кодирует один из двух целевых генов под контролем одинакового промотора и содержит один из двух совместимых между собой селекционных маркеров [226]. В этом случае в популяции стабильно трансфицированных клеток будут присутствовать варианты с различными соотношениями уровней экспрессии двух генов, однако при попытках последующей амплификации целевых генов в геноме продуцента под действием, например, возрастающих концентраций MTX будет наблюдаться преимущественно амплификация только одного из двух целевых генов, находящегося на плазмиде с геном селекционного маркера DHFR. Амплификация интегрированного в геном продуцента второго целевого гена будет возможна только в тех случаях, когда обе плазмиды интегрированы в один амплифицируемый генетический локус, то есть тандемно. Для большинства стабильно трансфицированных клеток будет наблюдаться увеличение экспрессии только одного гена, и, соответственно, секреция в культуральную среду смеси целевого гетеродимерного белка и избытка свободной субъединицы. Можно предположить, что для получения высокопродуктивных клональных линий из такой популяции клеток будет необходимо разделение исходной популяции на множество индивидуальных клонов и их последующая раздельная амплификация, при этом расщепление в паре целевых генов может произойти после некоторого числа транслокаций в геноме, то есть первоначально перспективные клоны могут оказаться непригодными для получения конечной высокой продуктивности.

Второй метод состоит в получении одной плазмиды, кодирующей оба целевых гена под контролем одинаковых или различных промоторов. В этом случае вероятность генетического расщепления целевых генов между собой и с геном селекционного маркера значительно уменьшается, но не исчезает, одновременно с этим относительные уровни экспрессии целевых генов в большинстве стабильно трансфицированных клеток остаются одинаковыми и постоянными. Если эти относительные уровни экспрессии не соответствуют секреции преимущественно гетеродимерного продукта, то при амплификации и последующем отборе клональных линий клеток доля свободной субъединицы в культуральной среде не изменится существенным образом [227].

Было предположено, что наиболее прочное генетическое сцепление между целевыми генами может быть обеспечено при помощи внутреннего сайта связывания рибосом из вируса энцефаломиокардита дикого типа (EMCV IRES), расположенного между OPC двух целевых генов и последующего аттенюированного IRES, отделяющего второй цистрон от OPC селекционного маркера, что предположительно позволяет амплифицировать целевые

гены с максимальной эффективностью, но не обеспечивает корректного соотношения их уровней экспрессии [228]. Второе предположение состоит в том, что уровень экспрессии того гена, продукт которого присутствует в недостатке, можно увеличить путем трансфекции «амплифицированной» поликлональной популяции клеток плазмидой, кодирующей только этот ген и снабженной другим селекционным маркером и последующего отбора клональных линий, в которых секретируется преимущественно гетеродимерный целевой белок.

2.6. Лютеинизирующий гормон человека

ЛГ – полипептидный гормон, который совместно с ФСГ отвечает за функционирование репродуктивной системы. В организме самок млекопитающих ЛГ стимулирует стероид генез в клетках фолликулов яичников, клетках желтого тела, а пиковое повышение его уровня инициирует овуляцию и образование желтого тела. В организме самцов ЛГ стимулирует интерстициальные клетки Лейдена семенников, вырабатывающие тестостерон.

ЛГ состоит из двух неидентичных нековалентные связанных гликопротеиновых субъединиц - альфа и бета. Молекулярная масса гетеродимера ЛГ около 30 кДа (масса полипептида). Альфа-субъединица, состоящая из 92 аминокислот, одинакова для ЛГ, ФСГ и хорионического гонадотропина. Соответственно, специфическую биологическую активность ЛГ определяет состоящая из 121 аминокислоты бета-субъединица ЛГ, которая специфически взаимодействует с мембранным рецептором.

В составе обеих субъединиц ЛГ содержится необычно много остатков пролина; их вторичная структура также жестко фиксирована множественными дисульфидными связями. В бета-субъединице ЛГ N-концевой аминокислотный остаток частично ацилирован по аминогруппе и, в отличие от ФСГ, присутствует только 1 сайт N-гликозилирования. Олигосахариды ЛГ, также как и у других гонадотропных гормонов, в основном сильно разветвлены и подвержены терминальному сиалированию, которое влияет на период полувыведения ЛГ. Для типичного препарата ЛГ человека, полученного из мочи, $T_{1/2}=20-30$ мин. Изолированные альфа- и бета-субъединицы не обладают биологической активностью. Дегликозилированный лютеинизирующий гормон значительно теряет биологическую активность и проявляет свойства физиологического антагониста нативного гормона.

2.6.1. Функции ЛГ

В начале репродуктивного цикла ЛГ стимулирует выработку андрогенов клетками теки. Андрогены затем переходят в гранулёзу и превращается в эстрогены путем ароматизации, опосредованной ФСГ. Дополнительным компонентом обратной связи для тека-клеток и гранулёзы являются секретлируемые ими полипептидные гормоны, в основном инсулиноподобный фактор роста, ингибин и активин, которые действуют как аутокринные и

паракринные факторы и усиливают ЛГ-опосредованную выработку андрогенов тека-клетками и ФСГ-опосредованную ароматизацию.

Овуляция зрелых фолликулов яичника индуцируется резким повышением уровня ЛГ, известным как преовуляторный выброс. ЛГ совместно с ФСГ вызывают быстрое разбухание фолликула в последние несколько дней перед овуляцией. ЛГ оказывает специфическое влияние на гранулёзу и теку, превращая их в клетки, секретирующие прогестерон.

2.6.2. Медицинские препараты ЛГ

На настоящий момент в клинической практике находится только оригинальное лекарственное средство рекомбинантного ЛГ - Луверис® (МНН лутропин альфа), препарат представляет собой лиофилизат для приготовления раствора для п/к введения 75 МЕ и получен при помощи клеток СНО.

Лекарственные препараты лютеинизирующего гормона человека (ЛГ) и фолликулостимулирующего гормона человека (ФСГ) широко используются в клинической практике при терапии бесплодия, в первую очередь при проведении экстракорпорального оплодотворения [229-232]. ЛГ и ФСГ для первых лекарственных препаратов выделяли из мочи менопаузальных женщин, впоследствии были получены препараты полностью очищенных рекомбинантных ЛГ и ФСГ. Свободные бета-субъединицы ЛГ и ФСГ практически неспособны взаимодействовать со своими рецепторами, биологическую активность в обоих случаях проявляют только гетеродимерные, полностью гликозилированные формы гормонов [233]. К настоящему моменту патентная защита оригинальных лекарственных препаратов рекомбинантного ЛГ истекла, что делает возможным организацию производства воспроизведенных препаратов рекомбинантного ЛГ для региональных рынков.

Было предположено, что высокопродуктивный продуцент гетеродимерного белка можно получить простым способом, а именно – ко-трансфекцией пары плазмид, кодирующих гены субъединиц этого белка и различные совместимые гены устойчивости, например дигидрофолатредуктазу (DHFR), обеспечивающую устойчивость к метотрексату (MTX), и глутаминсинтазу (GS), обеспечивающую устойчивость к метионилсульфоксиму (MSX). При одновременном введении в клетки пары плазмид, в части случаев может происходить их интеграция в один геномный локус. Для таких клеток последующая амплификация генетических конструкций в геноме под действием возрастающих концентраций ингибитора DHFR метотрексата будет приводить к одновременному увеличению копийности генов обеих субъединиц, то есть к повышению уровня биосинтеза

целевого гетеродимерного белка. Можно предположить, что в полученной поликлональной популяции клеток будут содержаться клоны с различными относительными уровнями биосинтеза альфа- и бета-субъединицы. При последующем получении клональных линий могут быть найдены и отобраны те из них, которые секретируют вместе с гетеродимерной формой целевого белка минимальные количества той свободной субъединицы, которую легче отделить от целевого белка при его хроматографической очистке.

Для проверки этих предположений может быть взят целевой белок ЛГ человека как имеющий большую медицинскую значимость и частичное сходство с ФСГ человека, что позволяет сравнить относительную эффективность двух подходов к созданию продуцентов гетеродимерных белков – при помощи одной полицистронной генетической конструкции и «корректирующей» плазмиды, либо при помощи пары плазмид, кодирующих по одному гену субъединиц целевого белка.

Несмотря на то, что проблемы координированной экспрессии нескольких генов в культивируемых клетках млекопитающих рассматриваются во множестве работ [234], практически во всех случаях такие исследования проводят для гуманизированных антител. Применимость полученных в этих работах результатов для разработки систем экспрессии гонадотропных гормонов весьма ограничена из-за отсутствия гомологии цепей иммуноглобулинов и гонадотропных гормонов и присутствия N-связанных олигосахаридов в обеих цепях гонадотропных гормонов, но не в легкой цепи иммуноглобулинов. В работах, описывающих создание линий клеток-продуцентов гонадотропных гормонов человека, были использованы как пары моноцистронных плазмид, так и векторы с тандемным расположением генов [235], однако во всех случаях были применены стандартные плазмиды с короткими промоторными областями, в основном – цитомегаловирусным промотором (CMV).

2.7. Конъюгаты полипептидов с полисиаловой кислотой как искусственные гликопротеиды

Полисиаловая кислота – это природный линейный полимер N-ацетилнейраминовой кислоты (Neu5Ac), содержащийся в клеточной стенке бактерий. Полисиаловая кислота может быть получена в больших количествах из клеточной стенки *E.coli* K12, очищена от примесей, частично гидролизована и разделена на фракции по размеру относительно недорогими методами. При внутривенной инъекции мышам фракций полисиаловой кислоты с различной средней молекулярной массой установлено, что время полужизни полисиаловой кислоты достигает 40 ч [236]. Полисиаловая кислота не иммуногенна для млекопитающих и по крайней мере в некоторых случаях может существенно уменьшить иммуногенность терапевтических белков, в частности, аспарагиназы [237] [237]. В отличие от полиэтиленгликоля и его производных, полисиаловая кислота подвергается биodeградации *in vivo* и продукты ее распада нетоксичны [237]. Вследствие этого, полисиаловая кислота имеет ряд преимуществ над синтетическими гидрофильными полимерами при получении пролонгированных версий лекарственных средств для продолжительного применения. К настоящему моменту для ряда терапевтических белков уже продемонстрировано, что их конъюгаты с полисиаловой кислотой сохраняют исходную биоактивность и имеют значительно увеличенный период полувыведения из системной циркуляции [238] [239].

Стандартный способ ковалентного конъюгирования полисиаловой кислоты с полипептидами, разработанный проф. Грегориadisом и сотрудниками и в дальнейшем коммерциализованный созданной им компанией LipoGen, состоит в окислении вицинальной гидроксильной группы (атом C7) конечного остатка нейраминовой кислоты до альдегидной формы при помощи периодата натрия, последующего образования основания Шиффа с депротонированными аминогруппами на поверхности белка и восстановления иминной формы конъюгата до вторичного амина (Рис. 9).

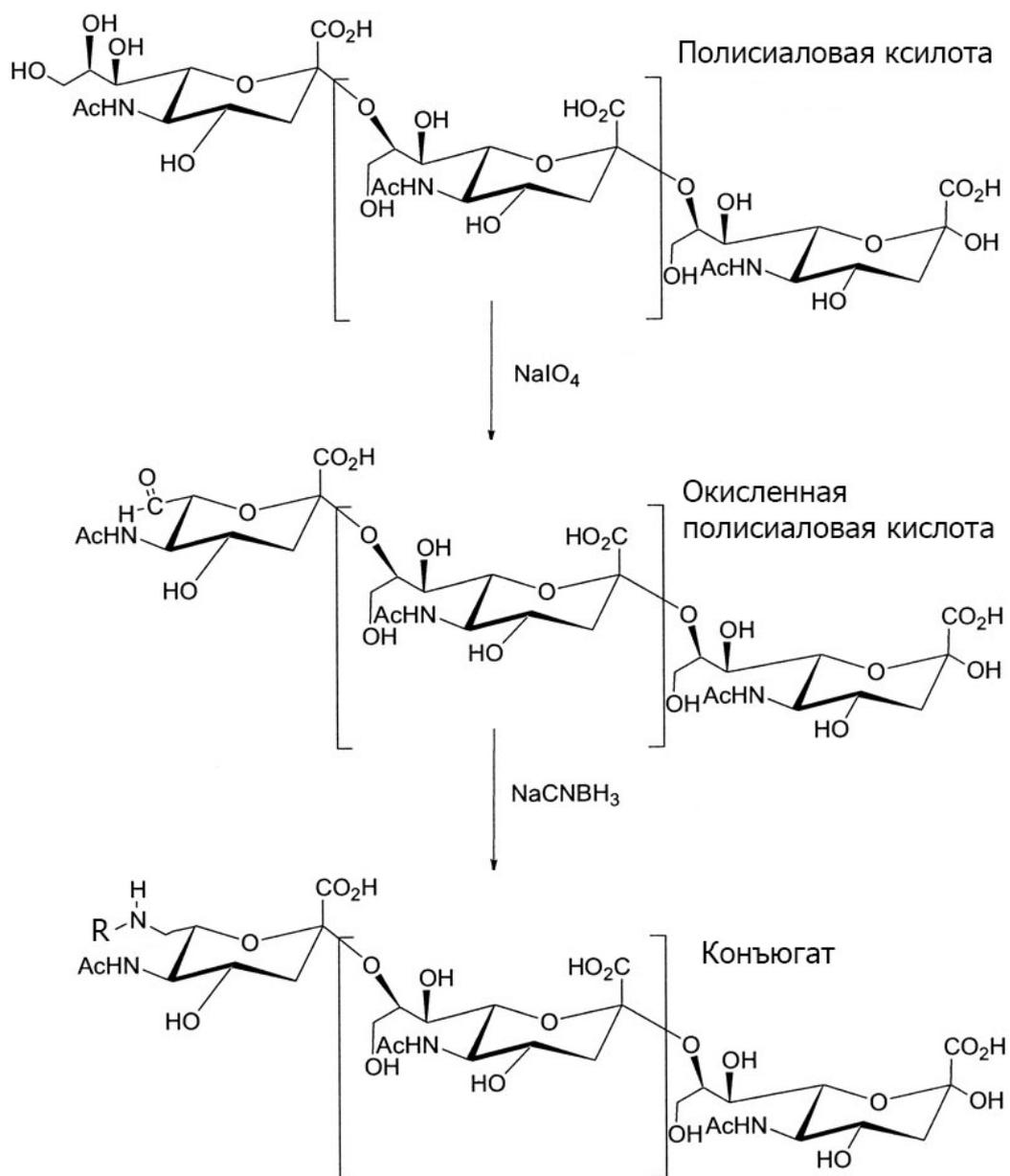


Рисунок 9. Схема активации и конъюгирования с белками полисиаловой кислоты.
R – белок.

2.7.1. Способы химической модификации инсулина

Инсулин является единственным полипептидным гормоном, непосредственно регулирующим захват глюкозы клетками. Инсулин в качестве лекарственного средства используется при диабете I типа как единственный эффективный вид терапии и при диабете II типа как последняя линия терапии. Распространенность этих видов диабета в мире постоянно увеличивается [240-242], при этом для части пациентов инсулиновая терапия позволяет прожить более 50 лет при полной зависимости от вводимого инсулина [243], особенно при поддержании надлежащего режима приема инсулина [244]. Одновременно с этим, у большинства диабетических пациентов постепенно развиваются осложнения основного заболевания, что обычно связывают с недостаточно полно проводимой терапией или с неадекватным контролем уровня глюкозы в крови [245]. Острые гипогликемические состояния могут приводить к потере сознания или смерти [246], а хронические колебания уровня глюкозы в крови в широком диапазоне могут приводить к развитию сердечно-сосудистых заболеваний, формированию незаживающих язв, а также положительно коррелируют с общим уровнем смертности и уровнями смертности от сердечно-сосудистых причин и онкологических заболеваний [247].

К настоящему моменту для инсулина получено и введено в клиническую практику несколько производных различных типов с измененной фармакокинетикой [248], в первую очередь вариантов с увеличенным и уменьшенным периодом полувыведения. Коротко действующий вариант инсулина (инсулин лизпро) был получен заменой пары аминокислот Lys29 и Pro28 в В-цепи инсулина, для него зона пиковой гипогликемической активности (для людей) составляет 30-60 мин против 2-3 ч для интактного инсулина [244]. Механизм быстрого действия инсулина лизпро – блокирование димеризации инсулина и их быстрый выход в системную циркуляцию из места инъекции [249]. Известные пролонгированные варианты инсулина – это конюгат миристиновой кислоты, точка прикрепления Lys29 в В-цепи (инсулин детемир) [250] и продукт генетических манипуляций инсулин гларгин – замены Asn->Gly21 в А-цепи и инсерции Arg31, Arg32 в В-цепи [251]. Для обоих данных вариантов инсулина зона пиковой активности составляет 3-9 ч. Механизм пролонгированного действия инсулина детемир может быть описан как комплексообразование с сывороточным альбумином, защищающая инсулин от почечной фильтрации. Механизм пролонгации действия инсулина гларгина несколько сложнее, и может быть описан как выпадение микрокристаллов цинковой формы инсулина гларгин в месте инъекции при повышении рН раствора и медленную диссоциацию этих кристаллов с последующим протеолитическим отделением С-концевых остатков от В-цепи и

восстановления связывания молекул инсулина гларгина с инсулиновым рецептором [252]. И инсулин детемир, и инсулин гларгин не стали совершенными вариантами инсулина, так как их концентрация в кровотоке обычно не позволяет организму пациента адекватно реагировать на изменение уровня глюкозы в крови, что приводит к проведению дополнительных инъекций короткодействующих инсулинов в случае инсулина детемира и принятию неизбежных побочных эффектов лекарства в случае инсулина гларгина, так как он считается несовместимым с другими вариантами инсулина.

В настоящий момент на разных стадиях исследований и разработок находятся различные классы производных инсулина, потенциально позволяющих сочетать возможности терапии в режиме «одна инъекция в день» и управления уровнем инсулина в зависимости от уровня глюкозы в крови. Например, конъюгаты инсулина с фенилбороновыми производными алифатических кислот способны изменять свою биологическую активность в зависимости от концентрации глюкозы в крови [253], а конъюгаты с линейными вариантами полиэтиленгликоля обладают сильно увеличенным временем полувыведения при полном блокировании димеризации инсулина *in vivo* [254]. Предположительно, конъюгаты инсулина с полисиаловой кислотой могут быть более безопасны для пациентов, чем конъюгаты с полиэтиленгликолем или реакционноспособными фенилбороновыми соединениями, при этом ожидаемое время их полувыведения может быть достаточным для использования режима терапии «одна инъекция в день».

2.7.2. Оксинтомодулин

Оксинтомодулин (ОХМ) является одним из пептидных гормонов кишечника, который регулирует уровень потребления пищи, процессы пищеварения и, в некоторой степени, пищевое поведение животных и человека. Он был впервые выделен из клеток тонкого кишечника свиньи. Последовательность ОХМ из 37 аминокислот содержит полную последовательность глюкагона и еще 8 аминокислот с С-конца молекулы [255]. ОХМ, как и другие производные от проглюкагона полипептидные гормоны, выбрасывается в системную циркуляцию после приема пищи и подавляет секрецию как желудочного сока, так и ферментов поджелудочной железы [256]. Также продемонстрировано, что ОХМ действует как сигнал насыщения [257].

ОХМ связывается с рецептором GLP-1 (glucagon-like peptide 1, глюкагоноподобный пептид 1, инкретин), но с меньшей аффинностью, чем собственно GLP-1 или синтетический амидопептид Эксенатид (Баета ®, эксендин-4). На настоящий момент для ОХМ не описан

отдельный рецептор или отдельный сайт связывания на рецепторе GLP-1, уникальная биологическая функция ОХМ также остается неизвестной [258].

ОХМ, так же, как и другие гормоны инкретинового ряда, подробно исследовался как потенциальное лекарственное средство при ожирении и потере контроля за уровнем глюкозы в крови. На животных моделях (грызуны) демонстрировалось, что ОХМ способен уменьшать массу тела животного и улучшать метаболизм глюкозы [259]. Для здоровых добровольцев и для страдающих ожирением пациентов также продемонстрировано, что подкожные инъекции ОХМ приводят к значительному снижению массы тела, продолжавшемуся в течение четырех недель исследования [260]. Основным фактором, препятствующим внедрению интактного ОХМ в клиническую практику, является его малый период полувыведения из системной циркуляции, около 6-8 минут у крыс [261]. Быстрое удаление ОХМ из кровотока происходит как за счет фильтрации в почках, так и вследствие специфического распада под действием мембраносвязанной дипептидил пептидазы IV (DPP-IV) [262]. Был создан ряд производных ОХМ, увеличивающий его время циркуляции в кровотоке. В основном были получены и исследованы конъюгаты ОХМ с жирными кислотами, позволяющие существенно уменьшить скорость почечного клиренса за счет связывания конъюгата в комплекс с белками плазмы [263], а также варианты ОХМ с заменой Ala в позиции 2 на другие аминокислоты, устойчивые к действию DPP-IV [264], и комбинации обоих типов модификаций [264, 265].

Другим общим методом увеличения времени циркуляции белков и пептидов в кровотоке является их конъюгация с гидрофильными полимерами, такими как (монометокси) полиэтиленгликоль или полисиаловая кислота. Для ОХМ не были описаны свойства конъюгатов с гидрофильными полимерами, однако для родственного ему пептида GLP-1 было продемонстрировано, что его конъюгат с полиэтиленгликолем биологически активен и обладает увеличенным периодом полувыведения [266].

Содержание работы

3. Материалы и методы

3.1. Методы работы с ДНК

3.1.1. Общие методы работы с ДНК

Выделение плазмидной ДНК: Выделение плазмидной ДНК проводили наборами Wizard Plus (Promega, США) или GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Литва) по инструкции производителя.

Измерение концентрации ДНК: концентрацию ДНК измеряли при помощи компактного флуориметра Qubit (Invitrogen, США) и наборов для флуоресцентной детекции Quant-iT™ DNA BR Assay Kit и Quant-iT™ DNA HS (Invitrogen, США) по инструкции производителя. Концентрацию чистой ДНК определяли спектрофотометрически на приборе Eppendorf BioPhotometer, качество препаратов ДНК определяли по отношению оптических плотностей D260 /D230 раствора (не менее 2,0).

Электрофорез ДНК в агарозном геле: Использовали 1% агарозный гель, содержащий 1X трис-боратный буфер и бромистый этидий в концентрации 0,5 мкг/мл. Пробы смешивали в соотношении 1:10 с буфером нанесения, содержащим 0,1% бромфенолового синего, 0,1M ЭДТА, pH 8,0, 50% глицерина. Электрофорез вели в 1X трис-боратном буфере на приборе для горизонтального электрофореза (Helicon, Россия) при напряжении при напряжении 5 В/см. По окончании электрофореза ДНК визуализировали в ультрафиолетовом свете (254 нм, трансиллюминатор Ultra Violet Products, США).

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля и очистка продуктов ПЦР: Фрагменты ДНК из агарозного геля или из смеси продуктов ПЦР очищали при помощи набора Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, США) по инструкции производителя.

Лигирование ДНК: Лигирование ДНК проводили с использованием ДНК-лигазы фага T4 и стандартного буферного раствора (Fermentas, Литва) в течение 1 часа при комнатной температуре или в течение 18 часов при температуре 14°C.

Секвенирование ДНК: Секвенирование ДНК проводили в Межинститутском Центре коллективного пользования «ГЕНОМ» ИМБ РАН, организованном при поддержке РФФИ с использованием набора BigDye Terminator v. 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, США) и капиллярного секвенатора ABI PRISM 3730 genetic analyzer (Applied Biosystems). Данные анализировали при помощи программы Chromas 1.45 (Technelysium Pty Ltd,

Австралия). Для секвенирования использовали праймерные олигонуклеотиды (Таб. 5), (Таб. 6) приведенные ниже.

Таблица 5. Праймерные олигонуклеотиды для сборки и секвенирования экспрессионных конструкций

Назначение	Название	Последовательность 5' - 3'
Создание и секвенирование бэбона pBL	IP-PL-F	AAGCTAGCGGCCGCGGATCCCCGGGTCTAGACATATGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC
	IP-PL-R	TCGCGATACGTACCTCGAGGTTATAAGAATTCTGCAGGTGGCACTTTTCGGG
	IP-TFpBL-F	GGCGCGCCATGGCTCTTCCGCTTCCTC
	IP-TFpBL-R	GAGCTCCGGACGTCGACATATGTCTAG
	SQ-BlaN-F	TAAGGGCGACACGGAAATG
	SQprimer	CGCTTCCTCGCTCACTGACT
Сборка EBV-TR	EBV-H1F1-F	AATTCATGCATGGCAATGGAGCGTGAAGAAGCGCCCCAGGGCTGACC CCGGCAAACGTGAC
	EBV-H1F1-R	CCGGGTACGTTTTGCCGGGTCAGCCCTGGGGCGCTTCTTCACGCTCC ATTGCCATGCATG
	EBV-H1F2-F	CCGGGGCTCCGGGGTGACCCAGGCAAGCGTGGCCAAGGGGCCCCTGG GTGACACAGGCAACCCTGACAAAGGCCCCCCAGGAAAGACCC
	EBV-H1F2-R	CCGGGGGTCTTTCTGGGGGGCCTTTGTCAGGGTTGCTGTGTACCC ACGGGCCCTTGGCCACGCTTGCTGGGTCACCCCGGAGCC
	EBV-H1F3-F	CCCGGGGGGCATCGGGGGGGTGTGGCGGGTCATGGGGGGGGCGGGT CATG
	EBV-H1F3-R	CGCGGCATGACCCGCCCCCCCCATGACCCGCCAACACCCCCCGATG CCCCCGGGT
	EBV-H1F4-F	CCGCGCATTCCTGGAAAAAGTGGAGGGGGCGTGGCCTTCCCCCGCG GCCCTTAGGA
	EBV-H1F4-R	CCTAGGGGGCCGCGGGGGGAAGGCCACGCCCCCTCCACTTTTTCCAG GAATG
	EBV-H2F1-F	GCTAGCCCCCGCAGAGAGCGGCGCAACGGCGGGCGAGCGGCGGG GGGTCGGGGTCCGCGGGCTCCGGA
	EBV-H2F1-R	ACCGGAGCCCGCGGACCCCGACCCCGCCGCTCGCCCGCCGTTGCG CCGCTCTGCGGGGGGGTAGCA
	EBV-H2F2-F	CCGGGGGCTGCGGGCGGTGGATGGCGGCTGGCGTT
	EBV-H2F2-R	CCGGAACGCCAGCCGCATCCACCGCCCGCAGCCC
	EBV-H2F3-F	CCGGGGATCGGGGGGGGTGCGGGGGCGCTGCGCGGGCGCAGCCAT GCGTGACCGTGATGAGATGCATG
	EBV-H2F3-R	AATTCATGCATCTCATCACGGTCACGCATGGCTGCGCCCGCGCAGCGC CCCCGACCCCCCCCCGATCC
	EBV-H1F2-SHORTF	GGTGACCCAGGCAAGCG
	EBV-H2F2-SHORTR	CAGCCGCCATCCACCG
EBV-H2F1-SHORTF	AGAGCGGCGCAACGGC	
Флакирующие области гена EEF1A	AD-5CHEF1-R	ACCTAGGGTTCTCAGCCAGTCG
	AD-5CHEF2-F	ATCTAGAAAATCTCTGTGAAAAAGG
	AD-5CHEF2-R	AGGATCCAACCTCAGAGTCAGG
	AD-5CHEF3-F	TGGATCCTTTAGAGCTACATGG
	AD-5CHEF3-R	TCCTAGGTAGACCAGGCTGACCTC
	AD-5CHEF4-F	AACTAGTGAGTTTCAGGGCACC
	AD-5CHEF4Xho-R	ACTCGAGATCCGGGTGTCCCTTC

Назначение	Название	Последовательность 5' - 3'
	AD-5CHEF1-F	AGAATCCCACGTTGTGCATAGAAACAG
	AD-5CHEF5-F	AGTCGACACAGCCTTGGCAGTG
	AD-5CHEF5-R	TCCATGGCCAGGCTGGCCTG
	AD-5CHEF61-F	ATCATGAAAGTAATTCTTGGAAATTTGCCATTTTGAGTTTGGAGCGAA GCTGATTGACAAAGCTGC
	AD-5CHEF61-R	CTTTGTCAATCAGCTTCGCTCCAAACTCAAATGGGCAAATTCCAAGA ATTACTTTCATGAT
	AD-5CHEF62-F	TTAGCCGTTCAAAGGTATTCTTCGAACTTTTTTTTTTAAGGTGTTGTGAA AACCTCGAGGA
	AD-5CHEF62-R	TCCTCGAGGTTTTTCAACAACCTTAAAAAAAAGTTCGAAGAATACCT TTGAACGGCTAAGCAG
	AD-3CHEF1-NheI	AGCTAGCATATTACCCCTAACACCTGC
	AD-3CHEF1-R	ATCTAGAGCAAAGCCTGCCTCA
	AD-3CHEF2-F	AGCTAGCAATTTTAGAACTAGT
	AD-3CHEF2-R	ACCTAGGCGTGACAAATTTTTC
	AD-3CHEF3-F	AGCTAGCATTCAACTTAGTGGT
	AD-3CHEF3-R	ACCTAGGGGGTTTGATTTCCC
	AD-3CHEF4-F	ACCTAGGCCTTCTGTCAGTAA
	AD-3CHEF4-R	AGAGCTCAAGAATAGCCTGGT
	AD-3CHEF5-F	AGAGCTCAGATTAGCCTGTCT
	AD-3CHEF5-R	TGGATCCTCCTGCCTCCAGAGACAAAAAC
	AD-3CHEF6-F	ATGATCATTGAGCATAGGGAG
	AD-3CHEF6-XbaR	ACTCGAGTCACTTGCTGTTCTTCCAGA
	AD-3CHEF6-XbaR	ACTCGAGTCACTTGCTGTTCTTCCAGA
Кассеты устойчивости	AD-HYG-AscF	TGGCGCGCCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAG
	AD-HYG-AscR	TGGCGCGCCTAGAGGTCGACGGTATACAG
Праймеры к векторам	M13dir	GTT TTC CCA GTC ACG AC
	M13rev	CAG GAA ACA GCT ATG AC
	T7prom	TAATACGACTCACTATAGGG
	SP6	GATTTAGGTGACACTATAG
	3CH1-Rev	ACAAACAGTTCTGAGACCG
	SQ-5CH6-F	GCCGCTGCTTCCTGTGAC
	IRESArev	AGGTTTTCCGGGCCCTCACATTG
Создание делеционного мутанта FVIII-SQ BDD	O1KpnIfor	GCTGGTACCTCACAGAGAATATACA
	O1HindIIIrev	GGAGAAGCTTCTTGGTTCAATG
	O2HindIIIfor	CCAAGCTTCTCCAAAACCCACAGTCTTGAAC
	O2BlnIrev	CTGCCCATGCTGAGCAGATAC
	Odelf	GCCACAACCTCAGACTTTTCG
	8sq4f	TGTATTTGATGAGAACCGAAGC
	8sq5r	GCCACTCTGAGCCCTGTT
	CMVfor	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
	8sq15r	GAGTTCTTTGTTTCTGAGTGCC
Сеquence	8sq1f	TGATCAGACCAGTCAAAGGGA
	8sq2f	GATTGGATGCCACAGGA

Назначение	Название	Последовательность 5' - 3'
	8sq3f	GCCCTCAGCGGATTGGT
	8sq4f	TGTATTTGATGAGAACCGAAGC
	8sq5f	TGCCATTGAACCAAGAAGC
	8sq6f	GAGAAACTGGGGACAACCTGC
	8sq7f	AGAAAGACTCACATTGATGGCC
	8sq8f	ACAAAGTGGTAGTAGGAAAGGGTG
	8sq9f	TGAAACAATTCAGACTCCCACT
	8sq10f	GACAAGTGCCACAAATTCAG
	8sq11f	TTTGTCCCTGAACGCTTGT
	8sq12f	CAGCCCTTATACCGTGGAG
	8sq13f	CAGATGGAAGATCCCACTTT
	8sq14f	GGATCAATCAATGCCTGGAG
	8sq15f	AGGAGTAATGCCTGGAGACC
	8sq1re	GCAAGCCAGGGAGGGAC
	8sq2re	TGGCAAACATATTGGTAAAGTA
	8sq3re	AGGGGAGTCTGACACTTATTGC
	8sq4re	GAGCAAATTCCTGTACTGTCACTT
	8sq5re	GCCACTCTGAGCCCTGTT
	8sq6re	CTTGGGATTTCCACTCTTCTTT
	8sq7re	CTGCTGGAAGATGAGAAGAGTT
	8sq8re	TGCTGGCTTGTATTAGGAGA
	8sq9re	GCCTTGCCCAGAGTTCAG
	8sq10re	AGTCAACAAAGCAGGTCCAT
	8sq11re	ACTGTCTATTGCTCCAGGTGA
	8sq12re	CTGAGAATGGGAATAGGGTGA
	8sq13re	GGGTCAGGCACCGAGGA
	8sq14re	GGATGCTTCTTGGCAACTGA
	8sq15re	GAGTTCTTTGTTTCTGAGTGCC

Таблица 6. Праймеры для клонирования и секвенирования открытых рамок считывания с последовательностью Козак.

ОПС	Название	Последовательность 5'-3'
eGFP	AD-EG-AbsF	TTCCTCGAGGCCGCCACCATGGTGAGCAAGGGC
	AD-EG-NheR	ATGCTAGCTTACTTGTACAGCTCGTC
DHFR	AD-DHFR-F	AAGATCTGCCACCATGGTTC
	AD-DHFR-R	ATCTAGATTAGTCTTCTTCTCGTAGAC
GS	AD-GS-BglNcoF	AGATCTGCCACCATGGCCACCTCAGCAAGT
	AD-GS-XbaR	TCTAGATTAGTTCTTGTATTGGAAGG
mCherry	AD-Cherry-AbsF	ACCTCGAGGCCGCCACCATGGTGAGCAAGG
	AD-Cherry-NheR	AAGCTAGCTTATCTAGATCCGGTGG
FVIII-BDD	AD-8-AbsF	ACCTCGAGGCCGCCACCATGGAAATAGAGCTCTCC
	AD-ONheI-R	AAGCTAGCTCAGTAGAGGTCCTGTGCC
FIX	AD-9-AbsF	TTCCTCGAGGCCGCCACCATGCAGCGCGTGAACATG
	AD-9-NheR	ATGCTAGCTTTCATTAAGTGAGCTTTG
	9SQf	CGGTATGTCAACTGGATTAAG
	9-AS	CTGCTGGTTCACAGGACTT
cVKOR	vkof1	GTCGACATGGGCACCACCTGAG
	vkof2	GACATGGGCACCACCTGGAGGAGCCC

ОПС	Название	Последовательность 5'-3'
	vkor1	CTCAGGGCCTTTTGGCCTTGTGTTC
	AD-CVKO-AbsIF	TTCCTCGAGGCCGCCACCATGGGCACCACCTGG
	AD-CVKO-NheIR	ATGCTAGCTCAGGGCCTTTTGGCCT
hVKOR	AD-hVKO-AbsIF	TTCCTCGAGGCCGCCACCATGGGCAGCACCTGGGGGA
	AD-hVKO-NheIR	ATGCTAGCTCAGTGCCTCTTAGCCTG
Фуриин	AD-FUR-AbsF	TTCCTCGAGGCCGCCACCATGGAGCTGAGGCCCTG
	AD-FUR-NheR	AATCTAGACTATCACTCAGGCAGGTGTGAGGGC
	IP-fvQ-F	GCTGCAGAGGGAGCCTCAAGTACAGTGGCTGGAACAGCAGGTG
	IP-fvQ-R	CACCTGCTGTTCCAGCCACTGTACTTGAGGCTCCCTCTGCAGC
	SQ-FUR639-F	CAACGGTGTCTGTGGTGTAGG
	SQ-FUR1228-F	GCCCACCTCAATGCCAACG
	SQ-FUR1563-R	CAGGGTGGAGCGGGTG
	SQ-fvQ-R	GTCCAGCCACTGTACTTG
Создание синтетического гена бета цепи LH		
LH b	AS-LH-4F	TTCCTCGAGGCCGCCACCATGGA
	AS-LH-3F	GGCCGCCACCATGGAGATGCTGCAGGGCCTCTTGCTCTTACTTCTACT GAGTATGGGTGGGGCCTGGGCTTCTCGGGAACCTCTACGT
	AS-LH-2F	TTCTCGGGAACCTCTACGTCCTTGGTGCCATCCGATCAACGCAATTCT GGCAGTTGAGAAGGAAGGCTGTCTGTGTGCATAACAGTC
	AS-LH-1F	TGTCCTGTGTGCATAACAGTCAATACCACAATTTGTGCAGGCTACTGC CCAACATATGATGAGGGTGTTCAGGCTGTTCTTCCTCCCC
	AS-LH-1R	CCTCTGGGGCAGCCAGGCAGTCTGATTGACTCAAATCTCACGTCGCGA TAGGTGCACACGACTTGAGGCAGGGGAGGAAGAACAGCCT
	AS-LH-2R	TCACTAGTGCTTCGCCTACATGGTCCACAGCGACAGGACAGTGCAAC AGGGAATGACACAACAGGATCGACACCTCTGGGGCAGCCAG
	AS-LH-3R	AGAGAAACAAGAGGCCAGAAAGCTGTGGGTGGTCACAGGTCAGTGG GTGATCTTTGGGTCTCCGCAATCACTAGTGCTTCGCCTACA
	AS-LH-4R	ATGCTAGCTCAGAGAAACAAGAGGCCAGAAA

ПЦР: ПЦР вели с использованием олигонуклеотидов, синтезированных ЗАО «Евроген», и смесей для ПЦР «Encyclo PCR kit», «Tersus polymerase mix» (Евроген, Россия) по инструкции производителя на приборе PTC-100 Thermal Cycler (MJ Reseach, США). Очищенные ПЦР-продукты клонировали в векторы pAL-TA (Евроген), pGEM-T (Promega, США) или pBL-T.

ПЦР с колоний *E. coli* проводили с использованием набора реактивов ScreenMix-HS (Евроген), по методике производителя, помещая образцы бактериальных клонов в пробирки с 10 мкл готовой смеси для ПЦР.

Компьютерные программы и базы данных для работы с последовательностями ДНК: В работе использовались следующие специализированные пакеты программ и базы данных: дизайн конструкций проводили при помощи пакета программ Vector NTI v.10.3.0 (Jul., 31, 2006), Invitrogen Corp. (США); расчет праймеров для проведения полимеразной цепной реакции проводили при помощи программ Primer Premier 5.00, (Premier Biosoft

International, Канада) и Beacon Designer v7.51. Использовалась публичная база данных БД NCBI (PubMed, CoreNucleotide, Genome, Gene, Protein, SNP) - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery>; количество повторяющихся элементов в последовательностях оценивали при помощи программы REPFIND [231].

Для разбиения геномных последовательностей на модули, содержащие гибридные рестриктные сайты была разработана программа BIOF, программа и ее исходный код доступен по адресу <http://sourceforge.net/projects/biof>, распространяется на условиях лицензии GNU GPL.

3.1.2. Создание экспрессионных конструкций

pOptivec/F8: Плазмиду pOptivec/F8 конструировали с использованием вектора pOptivec, полученного путем рециркуляризации линейного вектора pOptivec-ТОРО («Invitrogen», США). Плазмиду pOptivec расщепляли эндонуклеазой *NotI* и лигировали с фрагментом *NotI–NotI* плазмиды pCMV6-XL4/NM_000132, содержащей полноразмерную кДНК фVIII человека (Origene, США).

pOptivec/F8BDD: Для создания плазмиды для экспрессии делеционного мутанта фVIII BDD SQ методом ПЦР с использованием праймеров O1KpnIfor, O1Hindrev и O2Hindfor, O2BpIprev, соответственно (Таблица 5), получены фрагменты F1 (479 п.н.) и F2 (933 п.н.), фланкирующие область делеции.

Фрагмент F3 целевого гена, соответствующий N-концевой части фVIII, получали рестрикцией плазмиды pCMV6-XL4/NM_000132 эндонуклеазами *NotI* и *KpnI*. Сборку фрагментов F1-F3 проводили в векторе pAL-TA с образованием плазмиды pALTA/F123. Для ПЦР-анализа колоний использовали специфичный праймер Odelf и вектор-специфичные праймеры M13for и M13rev. *BpI–BpI*-фрагмент плазмиды pOptivec/F8 заменяли фрагментом *BpI–BpI* плазмиды pALTA/F123 и получали экспрессионную плазмиду pOptivec/F8BDD. ПЦР-анализ колоний вели с использованием двух пар специфических праймеров 8sq4f, 8sq5r и CMVfor, 8sq15r. Открытые рамки считывания (ОРС) полноразмерного фVIII и делеционного варианта BDD-фVIII, а также области основных функциональных элементов экспрессионных конструкций (промотора, участка IRES, терминатора транскрипции) секвенировали с использованием праймеров, приведенных в (Таб 5,6).

Получение вектора p.1.1

pVL-3: Для создания минимального базового вектора был применен метод инвертированной ПЦР с использованием длинных адапторных праймеров. Для изменения

участка клонирования и удаления ОРС бета-галактозидазы была проведена инвертированная ПЦР с использованием длинных адапторных праймеров IP-PL-F и IP-PL-R (Таб. 7) и плазмиды pUC18.

Таблица 7. Праймеры, использованные для получения минимального базового вектора методом инвертированной ПЦР с адапторных праймеров*

Название	Последовательность
IP-PL-F	Aagctagcggccgcgatcccgggtctagacatatgtcgacctctagctagagcttggcgtaatcatgggtcatagc
IP-PL-R	TGCGGATACGTACCTCGAGGTTATAAGAATTCTGCAGGTGGCACTTTTCGGG
IP-TFpBL-F	GGCGCGCCATGGCTCTTCCGCTTCCTC
IP-TFpBL-R	GAGTCCGGACGTCGACATATGTCTAGA
IP-XpBL-F	CCAAAGGAGTATTGGCTAGCGGCCGCGGATC
IP-XpBL-R	CCATACAAGTATTGGGCCCTCGAGGTTATAAGAATT
SQ-BlaN-F	<u>taagggcgacacggaaatg</u>
SQprimer	cgcttcctcgctcactgact

*Участки праймеров, комплиментарные матрице ПЦР подчеркнуты. Строчными буквами приведена последовательность праймеров, использованных для секвенирования.

Инвертированную ПЦР вели по [267]с модификациями. Каждый праймерный олигонуклеотид фосфорилировали отдельно. Реакцию проводили в буфере Трис-HCl, pH=7,5, содержащем 10 mM MgCl₂, 50 mM дитиотреитола, 1 mM АТФ и 100 пмоль олигонуклеотида, 1 ед. полинуклеотидкиназы фага T4 (Сибэнзим, Россия) в течение 30 мин при 37 °С. После окончания реакции фермент инактивировали при 65 °С 10 мин. Затем использовали праймеры для проведения инвертированной ПЦР в количестве 20пМ на реакцию. ПЦР проводили с использованием набора реактивов "Encyclo PCR kit". ПЦР проводили по следующей схеме: 1 цикл: 4 мин. 94°С, 2 мин. 50°С, 2 мин. 72°С; затем 11 циклов 1 мин. - 94°С, 1 мин. - 55°С, 2 мин. 72°С . После чего разводили вдвое однократным буфером эндонуклеазы *DpnI* добавляли эндонуклеазу *DpnI* (10 U) и инкубировали при 37°С 30 мин., затем вносили полимеразу *Pfu* (2.5U) и переносили на 72°С и инкубировали еще 30 мин. Полученную смесь очищали набором «Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System», после чего проводили лигирование очищенного продукта инвертированной ПЦР. Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* штамма TOP10, и высевали их на чашку Петри с твердой агаризованной средой, содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/1 мл агара и помещали в термостат на 37 С 18 часов. Колонии *E. coli*, отобранные в результате бело-голубого скрининга (целевые клоны были лишены гена галактозидазы и поэтому давали белые колонии), анализировали методом ПЦР с клонов, с использованием праймерных олигонуклеотидов к конститутивным элементам последовательностей исходной и мутантной плазмид - олигонуклеотидов SQ-BlaN-F и M13Rev. Отобранные клоны

наращивали, выделяли плазмидную ДНК pBL-3, определяли нуклеотидную последовательность с использованием олигонуклеотидов SQ-BlaN-F и M13Rev.

pBL-2: pLac промотор был удален при мутагенезе плазмиды pBL-3 методом инвертированной ПЦР с праймеров IP-TFpBL-F и IP-TFpBL-R, для секвенирования полученных конструкций использовали праймеры SQ-BlaN-F и SQprimer.

pBL-1: Для введения кассеты, содержащей два сайта узнавания эндонуклеазы *XcmI*, расположенные в противоположной ориентации, провели мутагенез плазмиды pBL-2 методом инвертированной ПЦР с использованием праймеров IP-XpBL-F и IP-XpBL-R для секвенирования полученных конструкций использовали праймеры SQ-BlaN-F и SQprimer.

pAL-EBV: ПЦР-продукт, содержащий терминальные повторы EBV собирали из синтетических олигонуклеотидов представленных в (Таб. 5); для аналитических ПЦР в процессе сборки использовали короткие специфические праймеры; для анализа полученной конструкции PAL-EBV использовали стандартные праймеры к последовательностям вектора PAL-TA - M13dir, M13rev; SP6, T7prom.

Праймеры EBV-N1F1-F и EBV-N1F1-R фосфорилировали, отжигали и клонировали в вектор PAL-TA. Реакцию фосфорилирования олигонуклеотидов проводили в буфере трис-HCl, pH 7,5, содержащем 10 mM MgCl₂, 50 mM дитиотреитола, 1 mM АТФ и 100 пмоль олигонуклеотида, 1 ед. полинуклеотидкиназы фага Т4 (Сибэнзим, Россия) в течение 30 минут при 37°C. После окончания реакции фермент инактивировали при 65°C 10 мин.

Для получения дуплекса вносили в пробирку по 100 пмоль каждого олигонуклеотида, нагревали до 95°C, медленно охлаждали до комнатной температуры и лигировали с вектором PAL-TA с использованием ДНК-лигазы фага Т4 и стандартного буфера. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* штамма DH5alpha. Колонии *E. coli*, отобранные в результате бело-голубого скрининга, анализировали методом ПЦР с клонов, с использованием праймеров EBV-N1F1-F и EBV-N1F1-R, отобранные клоны наращивали в 5 мл среды 2xYT-Amp и выделяли плазмидную ДНК и получали плазмиду PAL-N1F1. После чего выделяли фрагмент PAL-N1F1/*XmaI* из 1,5% агарозного геля. Праймеры EBV-N1F3-F, EBV-N1F3-R и EBV-N1F4-F и EBV-N1F4-R отжигали попарно (нагревали до 95°C и медленно охлаждали до комнатной температуры), фосфорилировали как описано выше и лигировали два дуплекса между собой, после чего клонировали в вектор PAL-TA как описано выше. Получали плазмиду PAL-N1F3-4, обрабатывали рестриктазой *XmaI* и лигировали с фрагментом PAL-N1F1/*XmaI*, отбирали клоны и выделяли плазмиды как описано выше. Полученную плазмиду PAL-N1F1-3-4 обрабатывали эндонуклеазой *XmaI* и лигировали с дуплексом фосфорилированных частично комплементарных праймеров EBV-

H1F2-Ф и EBV-H1F2-R, образующих выступающие «липкими» 5'-концы, комплементарные липким концам, образующимся при рестрикции плазмиды-акцептора эндонуклеазой *XmaI*. Трансформацию проводили как описано выше. Клоны PAL-H1 анализировали методом ПЦР с клонов при помощи праймеров EBV-H1F2-SHORTF, EBV-H1F1-R, M13dir, M13rev.

Праймеры EBV-H2F1-Ф и EBV-H2F1-R фосфорилировали, соединяли в дуплекс нагревом-охлаждением и клонировали в вектор PAL-TA, полученную плазмиду PAL-H2F1 обрабатывали рестриктазой *BspEI* и подставляли двухцепочечный адаптор, полученный из праймеров EBV-H2F2-Ф и EBV-H2F2-R, выступающие 5'-концы которых комплементарны липким концам, образующимся при обработке рестриктазой *BspEI* с исчезновением одного сайта рестрикции. Полученную плазмиду PAL-H1F1-2 обрабатывали по сохранившемуся уникальному сайту рестриктазой *BspEI* и подставляли двуцепочечный адаптор, полученный из праймеров EBV-H2F3-Ф и EBV-H2F3-R. Клоны PAL-H2 анализировали методом ПЦР с клонов при помощи праймеров EBV-H2F2-SHORTR 2, EBV-H2F2-SHORTF, M13dir, M13rev.

Две половины целевой последовательности EBV-H1 и EBV-H2 собирали по сайтам рестрикции *AvrII/NheI*. Полученную конструкцию PAL-EBV секвенировали с использованием праймеров SP6, T7prom.

PBL-2-ID и PBL-2-ID-EBV: ОРС, кодирующую дигидрофолатредуктазу мыши, получали методом ПЦР с использованием праймеров AD-DHFR-F, AD-DHFR-R и плазмиды pOptives-circ в качестве матрицы, набором реактивов "Encyclo PCR kit", ПЦР-продукт очищали из 1% агарозного геля и лигировали в векторную плазмиду pAL-TA. Лигазными смесями трансформировали клетки *E. coli* штамма DH5alpha и вели отбор клонов и выделение плазмид как описано выше. Полученную конструкцию PAL-DHFR секвенировали с использованием праймеров SP6 и T7prom.

Фрагмент, кодирующий внутренний сайт связывания рибосом (IRES) вируса энцефаломиокардита (EMCV), переносили рестрикцией из pOptives-circ. Для этого pOptives-circ, обрабатывали рестриктазами *BamHI-BglII* и лигировали в PAL-DHFR/ *BglII* с образованием плазмиды pAL-ID. Для её секвенирования использовали праймеры IRESrev, IRESArev и AD-DHFR-F.

В качестве основы для сборки целевого вектора использовали вектор PBL-2. Фрагмент, содержащий IRES-DHFR, вырезали из плазмиды pAL-ID рестриктазами *NotI* и *XbaI*, лигировали в PBL-2 / *NotI* и *XbaI* с образованием плазмиды PBL-2-ID 3. Анализ клонов вели с праймеров AD-DHFR-F и SQ-BB-R. Для её секвенирования использовали праймеры SQ-

BlaN-F и SQ-BB-R. Фрагмент, содержащий EBVTR, вырезали из плазмиды pAL-EBV рестрикцией *NsiI*, и лигировали в PBL-2-ID / *PstI* с образованием плазмиды PBL-2-ID-EBV.

p1.1(EBVTR-) и p1.1: Фрагмент, соответствующий области 8532-12603 для записи GenBank AY188393, получали методом ПЦР с использованием геномной ДНК выделенной из клеток CHO DG44 и праймеров представленных в таблице 5. Фрагменты 5CHEF-F1 - 5CHEF-F5, полученные методом ПЦР с геномной ДНК CHO DG44 клонировали в вектор PAL-TA и секвенировали с использованием праймеров SP6, T7prom. Фрагмент 5CHEF-F6 получали отжигом праймеров AD-5CHEF61-F; AD-5CHEF61-R; AD-5CHEF62-F; AD-5CHEF62-R и также клонировали в вектор PAL-TA и секвенировали с использованием праймеров SP6и SQ-5CH6-F.

Акцептор PAL-5CHEF-F1/ *NotI-AvrII*, содержащий фрагмент 5CHEF-F1 , лигировали с *XbaI-PspOMI* фрагментом PAL-5CHEF-F2, содержащим фрагмент 5CHEF-F2и получали PAL-5CHEF-F12. Акцептор PAL-5CHEF-F12/ *NotI-BamHI*, содержащий фрагменты 5CHEF-F1-2, лигировали с *BamHI - NotI* фрагментом PAL-5CHEF-F3, содержащим фрагмент 5CHEF-F3и получали PAL-5CHEF-F123. Акцептор PAL-5CHEF-F123/ *NotI-AvrII*, содержащий фрагменты 5CHEF-F1-2,-3 лигировали с *SpeINotI* фрагментом PAL-5CHEF-F4, содержащим фрагмент 5CHEF-F4и получали PAL-5CHEF-F1234. Акцептор PAL-5CHEF-F5/ *NcoI*, содержащий фрагмент 5CHEF-F5 , лигировали с *BspHI-PciI* фрагментом PAL-5CHEF-F6, содержащим фрагмент 5CHEF-F6и получали PAL-5CHEF-F56. Акцептор PAL-5CHEF-F1234/ *XhoI*, содержащий фрагменты 5CHEF-F1-2-3-4, лигировали с *Sall-Sall* фрагментом, PAL-5CHEF-F56, содержащим фрагменты 5CHEF-F5-6, определяли ориентацию с использованием AD-5CHEF5-R и AD-5CHEF4-F и получали PAL-5CHEF.

PAL-5CHEF расщепляли рестриктазой *EcoRI* и *AbsI* и полученный фрагмент лигировали в плазмиду PBL-2-ID-EBV/ *EcoRI-AbsI* с образованием плазмиды PBL-2-ID-5CH , а также в плазмиду PBL-2-ID/ *EcoRI-AbsI* с образованием плазмиды PBL-2-ID-EBV-5CH. Фрагмент, соответствующий области 3'CHEF 14545-18794 AY188393, получали методом ПЦР с использованием геномной ДНК, выделенной из клеток CHO DG44. С использованием адапторных праймеров, представленных в таблице 6, несущих сайты узнавания рестриктаз для последующей сборки, были получены фрагменты 3CHEF1 - 3CHEF6, которые клонировали в PAL-TA и секвенировали с использованием праймеров SP6, T7prom.

Акцептор PAL-3CHEF-F3, содержащий фрагмент 3CHEF-F3, расщепляли рестриктазой *NheI*, лигировали фрагмент *NheI-AvrII* из PAL-3CHEF-F2, содержащий фрагмент 3CHEF-F2 , отбирали методом ПЦР клоны с правильной ориентацией вставки. Полученные конструкции

рестрицировали *NheI*, и лигировали с фрагментом *NheI-XbaI* плазмиды PAL-3CHEF-F1, содержащей 3CHEF-F1, отбирали методом ПЦР клоны с правильной ориентацией вставки. Акцептор PAL-3CHEF-F5, содержащий фрагмент 3CHEF-F5, расщепляли рестриктазами *PciI-SacI* и лигировали фрагмент *NcoI-SacI* плазмиды PAL-3CHEF-F4, содержащий 3CHEF-F4. Затем расщепляли акцептор, содержащий собранные фрагменты 3CHEF-F1-3, эндонуклеазами *AvrII – PspOMI* и лигировали очищенные фрагменты 3CHEF-F4-5, полученные из PAL-3CHEF-F45 рестрикцией *AvrII – BamHI*, и 3CHEF-F6, полученный из PAL-3CHEF-F6/ *BclI- NotI*.

PAL-3CHEF расщепляли рестриктазами *NheI* и *XhoI* и полученный фрагмент лигировали в плазмиду PBL-2-ID-5CH /*XbaI-Sall* с образованием плазмиды p1.1(EBVTR-), а также в плазмиду PBL-2-ID-EBV-5CH/*XbaI-Sall* с образованием плазмиды p1.1.

p1.1-EGFP и p1.1(EBVTR-)-EGFP: С использованием праймеров AD-EG-AbsF и AD-EG-NheR и pEGFP-N2 (Clontech, США) в качестве матрицы получили ПЦР-продукт eGFP PCR, содержащий OPC зеленого флуоресцентного белка, который клонировали в вектор pAL-TA и анализировали секвенированием области вставки, используя праймеры T7 и SP6. После обнаружения клонов с корректной нуклеотидной последовательностью, плазмиду pAL- eGFP расщепляли рестриктазами *AbsI* и *NheI* и переносили фрагмент, содержащий OPC eGFP с участком консенсусной последовательности Козак в векторы p1.1 и p1.1(EBVTR-) с образованием p1.1- eGFP и eGFP-p1.1(EBVTR-) соответственно.

p1.1-F8BDD: OPC, кодирующую BDD-фVIII, получали методом ПЦР с использованием праймеров AD-8C-AbsF, AD-8G-AbsF и AD-ONheI-R и плазмиды pOptivec/F8BDD в качестве матрицы, набором реактивов «Tersus», ПЦР-продукт очищали электрофорезом в 1% агарозном геле, выделяли из геля при помощи микроколоники и лигировали в векторную плазмиду PAL-TA. Лигазными смесями трансформировали клетки *E. coli* штамма DH5alpha и вели отбор клонов, выделение плазмид и полное секвенирование области вставки полученной плазмиды с использованием праймеров SP6 и T7prom и специфических праймеров. Плазмиду pAL-F8BDD-AN расщепляли рестриктазами *AbsI* и *NheI* и переносили фрагмент, содержащий OPC BDD-фVIII с участком консенсусной последовательности Козак в вектор p1.1 с образованием p1.1-F8BDD.

p1.2-Mono, промежуточный вектор для последующего введения областей генов устойчивости к действию антибиотиков, был получен путем удаления из плазмиды p1.1 области, содержащей EMCV IRES и OPC DHFR без внесения изменений в ДНК нетранслируемых областей гена EEF1A1. Области генов устойчивости к действию антибиотиков, окруженные промотором SV40 и терминатором транскрипции SV40 были

получены путем ПЦР из плазмид pcDNA3.1/Hygro, pcDNA3.1(+), и pcDNA4/HisMax-TOPO (Invitrogen). Области генов устойчивости были субклонированы в Т-вектор и затем перенесены рестрикцией-лигированием в плазмиду p1.2-Mono с образованием плазмид p1.2-Hygro, p1.2-Neo и p1.2-Zeo. Фрагмент ДНК, кодирующий eGFP и консенсусную последовательность Козак был перемещен из плазмиды p1.1eGFP в плазмиды с генами устойчивости к действию антибиотиков с образованием плазмид **p1.2-Hygro-eGFP**, **p1.2-Neo-eGFP** и **p1.2-Zeo-eGFP**.

Фрагменты ДНК, кодирующие целевые открытые рамки считывания (ОРС) генов фИХ человека, VKORC1 человека или китайского хомячка или фурина человека, слитые с консенсусной последовательностью Козак, получали методом ПЦР с использованием соответствующих адапторных праймерных олигонуклеотидов. Продукты ПЦР выделяли из 1% агарозного геля, используя набор реактивов Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, США) и лигировали с Т-вектором pAL-TA (Евроген, Москва) при помощи ДНК-лигазы фага Т4 (Fermentas, Литва). ПЦР проводили с использованием олигонуклеотидов и смесей для ПЦР Encyclo PCR kit, Tersus polymerase mix, ScreenMix-HS (Евроген) на приборе PTC-100 Thermal Cycler (MJ Reseach, США). Для целей молекулярного клонирования использовали штамм *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Выделение плазмидной ДНК проводили при помощи набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Литва).

В качестве источника ОРС фИХ использовали коммерчески доступный клон кДНК фИХ человека pCMV6-XL4/NM_000133.2 (sc126517, Origene, США) и адапторные праймеры AD-9-AbsF и AD-9-NheR. Для VKORC1 человека область ОРС амплифицировали с плазмиды pCMV6-XL4/ NM_024006.4 (sc112318, Origene) с праймерами AD-hVKO-AbsIF и AD-hVKO-NheIR.

Для получения ОРС VKORC1 китайского хомячка из 2 млн. клеток CHO DG44 реагентом TRI Reagent (MRC) была выделена тотальная РНК. Синтез кДНК проводили при помощи набора MINT (Евроген), используя 2 мкл РНК матрицы. Амплификацию кДНК проводили с помощью набора Encyclo PCR Kit, для ПЦР области ОРС использовали праймеры vkof1, vkof2, vkor1. Продукт ПЦР клонировали в вектор pAL-TA с образованием плазмиды pAL-CHOVKORC1. Последовательность полученной вставки была депонирована 03.04.2012 в GenBank с номером JQ400047.1 Аминокислотная последовательность ОРС фермента VKORC 1 клеток CHO DG44 депонирована в GenBank с номером AFG26681.1. При помощи адапторных праймеров AD-CVKO-AbsIF и AD-CVKO-NheIR и плазмиды pAL-CHOVKORC1 в качестве матрицы получили ПЦР-продукт, содержащий ОРС VKORC1

китайского хомячка с добавленными сайтами рестрикции для субклонирования в экспрессионный вектор.

ОПС PACE/furin человека получали в ходе ПЦР с использованием праймеров AD-FUR-AbsF и AD-FUR-XbaR и плазмиды SC118550 (Origene) в качестве матрицы. ПЦР-продукт, содержащий ОПС растворимого делеционного варианта протеазы PACE/furin человека с делецией двух аминокислот (VQ), клонировали в вектор pAL-TA с образованием плазмиды pAL-Fur, после чего приводили ОПС в соответствие с эталонной последовательностью NM_002569, вводя шесть недостающих нуклеотидов методом инвертированной ПЦР с использованием праймеров IP-fVQ-F и IP-fVQ-R. Мутагенез проводили по методу, предложенному в [267] со следующими модификациями: фосфорилирование праймеров проводили полинуклеотидкиназой фага T4 (Сибэнзим) в течение 30 минут при 37°C в буфере для ДНК-лигазы фага T4 (Fermentas) в течение 30 минут при 37°C; ПЦР проводили с помощью набора Encyclo PCR kit по следующей схеме: 1 цикл: 4 мин. 94°C, 2 мин. 50°C, 2 мин. 72°C; затем 11 циклов 1 мин. - 94°C, 1 мин. - 55°C, 2 мин. 72°C, разводили вдвое однократным буфером эндонуклеазы *DpnI*, добавляли 10 U этой эндонуклеазы и инкубировали при 37°C 30 минут, затем инкубировали при 72°C с 2.5 Ед. полимеразы Pfu еще 30 минут, продукт ПЦР очищали и лигировали. Для поиска измененных участков ДНК методом ПЦР с колоний использовали специфический олигонуклеотид SQ-fVQ-R.

Полученные плазмиды **pAL-F9**, **pAL-hVKORC1-AN**, **pAL-CHOVKORC1-AN**, **pAL-FurVQ**, секвенировали в области вставки, корректные ОПС переносили в экспрессионные векторы p1.1, p1.2-Zeo или p1.2-Hyg по *AbsI-NheI* с образованием результирующих плазмиду **p1.1-F9**, **p1.2-Zeo-hVKORC**, **p1.2-Zeo-VKORC**, **p1.2-Hyg-Fur**, соответственно. ДНК для трансфекции выделяли препаративно наборами EndoFree Plasmid MaxiKit (Qiagen, США) или ДНК GeneJet™ Midi (Fermentas). Подготовку плазмид к трансфекции вели, как указано ниже, в случае p1.2-Hyg-Fur линейаризацию вели при помощи рестриктазы *BspHI* вместо *PvuI*.

pUC57-Kan- FSH-AIB: синтетический фрагмент FSH-AIB (Genscript, США), клонирован в плазмиду pUC57-Kan (GENEWIZ, Inc., США).

pUC57-Kan-FSH-BIA: синтетический фрагмент FSH-BIA (Genscript, США), клонирован в плазмиду pUC57-Kan (GENEWIZ, Inc., США).

p1.3-FSH-AIB: плазмиду pUC57-Kan-FSH-AIB расщепляли эндонуклеазами *AbsI* и *NheI* и переносили фрагмент, содержащий ОПС обеих цепей ФСГ, IRES и участок консенсусной последовательности Козак, в вектор p1.1 рестрицированный теми же эндонуклеазами, с образованием p1.3-FSH-AIB.

p1.3-FSH-BIA: плазмиду pUC57-Kan-FSH-BIA расщепляли эндонуклеазами *AbsI* и *NheI* и переносили фрагмент, содержащий OPC обеих цепей ФСГ, IRES и участок консенсусной последовательности Козак, в вектор p1.1 рестрицированный теми же эндонуклеазами, с образованием p1.3-FSH-BIA.

p1.2-Neo-FSH-A-chain: плазмиду pUC57-Kan-FSH-AIB расщепляли эндонуклеазами *AbsI* и *SpeI* и переносили фрагмент, содержащий OPC альфа цепи ФСГ и участок консенсусной последовательности Козак, в вектор p1.2-Neo, рестрицированный эндонуклеазами *AbsI* и *NheI*, с образованием p1.2-Neo-FSH-A-chain.

p1.2-Neo-FSH-B-chain: плазмиду pUC57-Kan-FSH-BIA расщепляли эндонуклеазами *AbsI* и *SpeI* и переносили фрагмент, содержащий OPC альфа цепи ФСГ и участок консенсусной последовательности Козак, в вектор p1.2-Neo, рестрицированный эндонуклеазами *AbsI* и *NheI*, с образованием p1.2-Neo-FSH-B-chain.

p1.2-Hygro-FSH-A-chain: плазмиду pUC57-Kan-FSH-AIB расщепляли эндонуклеазами *AbsI* и *SpeI* и переносили фрагмент, содержащий OPC альфа цепи ФСГ и участок консенсусной последовательности Козак, в вектор p1.2-Hygro, рестрицированный эндонуклеазами *AbsI* и *NheI*, с образованием p1.2-Hygro-FSH-A-chain.

p1.2-Hygro-FSH-B-chain: плазмиду pUC57-Kan-FSH-BIA расщепляли эндонуклеазами *AbsI* и *SpeI* и переносили фрагмент, содержащий OPC альфа цепи ФСГ и участок консенсусной последовательности Козак, в вектор p1.2-Hygro, рестрицированный эндонуклеазами *AbsI* и *NheI*, с образованием p1.2-Hygro-FSH-B-chain.

p1.2-GS: OPC глутаминсинтазы крысы амплифицировали праймерами AD-GS-BglNcoF и AD-GS-XbaR, содержащими синтетическую консенсусную последовательность Козак. Продукт ПЦР субклонировали в плазмиду pAL-Zeo по рестриктным сайтам *NcoI*-*XbaI*. Рестриктный фрагмент полученной плазмиды pAL-GS, содержащий OPC глутаминсинтазы крысы под контролем промотора и терминатора вируса SV40, по сайту *AscI* переносили в плазмиду p1.2-mono, отбирали клоны, в которых направления транскрипции с промоторов SV40 и EEF1A совпадают.

p1.2-GS-mCherry: Фрагменты, содержащие OPC mCherry с участком консенсусной последовательности Козак, получали при ПЦР с праймерами AD-Cherry-AbsF + AD-Cherry-NheR, в качестве матрицы использовали плазмиду pmCherry-N1 (Clontech, США). Целевую OPC переклонировали по сайтам *AbsI* и *NheI* в экспрессионный вектор p1.2-GS с образованием плазмиды p1.2-GS mCherry

3.1.3. Препаративное получение плазмид для трансфекции

Плазмидные ДНК для трансфекции нарабатывали в клетках *E. coli* штамма Stb14, трансформированных экспрессионными конструкциями, кодирующими ОРС фVIII, в остальных случаях использовали штамм TOPP10. Клетки культивировали в 0.5 л среды ТВ в течение 18 ч, и выделяли плазмиды с использованием набора EndoFree Plasmid MaxiKit (Qiagen, США) по протоколу фирмы-производителя или набора ДНК GeneJet™ Midi (Fermentas, Литва)/ При получении стабильно трансфицированных линий клеток использовали линейаризованные плазмиды, если в тексте не указано иное. Продукты рестрикции эндонуклеазой *PvuI* осаждали этанолом, осадки ДНК растворяли в фосфатно-солевом буфере (PBS) и стерилизовали фильтрацией через 0.22 мкм фильтры (Millipore, США).

3.2. Методы работы с бактериями *Escherichia coli*

Приготовление музея штамма: Из отдельной колонии бактерий выращивали ночную культуру, добавляли глицерин до концентрации 12%, инкубировали 20 минут, делили на аликвоты по 1 мл, замораживали их в жидком азоте и хранили при -70°C. Штамм из музея рассеивался истощающим штрихом на чашку Петри, содержащую 30 мл среды LB-агар, инкубировался 14-16 часов.

Ночная культура: Бактериальную колонию помещали в 5 мл среды LB или 2xYT с добавлением селективного антибиотика и наращивали клетки при перемешивании при 37°C в течении одной ночи.

Получение компетентных клеток: Клетки из музея штамма истощающим штрихом высевались на чашку Петри с LB-агаром без антибиотика, инкубировались 14 часов при 37°C в воздушном термостате. Отдельную колонию инокулировали в 5 мл 2xYT без антибиотика для получения ночной культуры и растили при 37°C с хорошей аэрацией. На следующий день 250 и 750 мкл ночной культуры высевали с разбавлением 1:1000 и 1:333 соответственно в 2 колбы, содержащие по 250 мл среды SOB, и растили при 37°C с хорошей аэрацией до оптической плотности 0,4 О.Е. Затем клетки охлаждали во льду около десяти минут, стерильно переносили в охлажденные центрифужные стаканы на 250 мл, центрифугировали на центрифуге Beckman, 4000g 10 минут при 0-4°C.

Получение клеток для трансформации методом электропорации: Суспендировали осадок клеток в небольшом объеме ледяной стерильной деионизированной воды, переносили в стерильные охлажденные центрифужные стаканы на 35мл, доливали деионизированной водой, центрифугировали в тех же условиях. Повторяли еще 2 раза промывку водой, затем

промывали охлажденным 10% глицерином. Осадок суспендировали в 2-3 мл 10% глицерина, разносили по 100 мкл в стерильные охлажденные микропробирки, после чего замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C .

Получение клеток для химической трансформации: Осадок клеток суспендировали в 80 мл охлажденного буфера ТВ (10 мМ PIPES, 55мМ MnCl_2 , 15мМ CaCl_2 , 250мМ KCl), инкубировали во льду 10 мин, центрифугировали при 4000g 10 минут при $0-4^{\circ}\text{C}$, осадок ресуспендировали в 20 мл ТВ и, медленно помешивая, добавляли ДМСО до 7% (1,5 мл), инкубировали 10 мин, делили на аликвоты по 200 мкл, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C .

Компетентность клеток проверялась при трансформации плазмидой с известной концентрацией и принималась равной (количеству выросших колоний)/(количество плазмиды, мкг).

Электропорация: Электропорация проводилась на приборе фирмы Genetronics и с использованием 1 мм кювет фирмы BioRad. К размороженной на льду аликвоте (100 мкл) электрокомпетентных клеток добавляли раствор плазмиды или очищенную и обессоленную лигазную смесь, перемешивая, переносили клетки в охлажденную кювету и проводили электропорацию (1,2-1,4 кВ при времени разряда 5,19-5,22 мкс и зазоре между электродами кюветы 1 мм). Переносили в 1мл теплой среды SOC без антибиотиков, инкубировали в воздушном термостате при 37°C 1 час для начала экспрессии генов устойчивости к селективным антибиотикам. Затем высевали (100 мкл при трансформации плазмидой, 1мл при трансформации лигазной смесью) на чашку Петри с LB-агаром, с добавлением селективных антибиотиков, и помещали в суховоздушный термостат на 37°C на 14-16 часов.

Химическая трансформация: К 100 мкл замороженной суспензии клеток *E. coli* добавляли 5 мкл лигазной смеси, инкубировали на льду 30 минут для сорбции плазмидной ДНК, нагревали до 42°C на 60 секунд и инкубировали на льду 5 минут. После чего добавляли 800 мкл питательного бульона SOC и инкубировали при 37°C 60 минут, затем переносили суспензию на чашку Петри с твердой агаризованной средой, содержащей селективный антибиотик и помещали в термостат на 37°C 18 часов.

3.3. Методы работы с культурами клеток млекопитающих

Использовали дефектные по гену *DHFR* клетки CHO DG-44 (Invitrogen), адаптированные к суспензионному культивированию в среде определенного химического состава. Клетки выращивали в колбах Эрленмейера (VWR Scientific, США) в 30 мл среды CD DG-44 (Invitrogen) с добавлением 8 мМ *L*-глутамина (Invitrogen) и 0.18% сурфактанта

Pluronic F-68 («BASF Inc.», США), в CO₂-инкубаторе (37°C, 8% CO₂) при перемешивании на орбитальной качалке с постоянной скоростью 130 об/мин. При каждом пассировании измеряли концентрацию клеток и их жизнеспособность с использованием окрашивания трипановым синим. Клетки пассировали каждые 2–3 дня по достижении культурой плотности 1.2×10^6 живых клеток в 1 мл, суспензию клеток разбавляли свежей средой в соотношении 1 : 4.

Клетки линии CHO-S («Invitrogen») выращивали в условиях, аналогичных культивированию клеток CHO DG-44 (37°C, 8% CO₂, 130 об/мин). Клетки CHO-S культивировали в безбелковой среде ProCHO 5 («Lonza», Швейцария) с добавлением 8 мМ L-глутамина («Invitrogen»). Пассирование культуры проводили по достижении плотности 1,8 млн клеток/мл, посевная концентрация составляла 0,3 млн клеток/мл.

3.3.1. Трансфекция и культивирование транзичентно трансфицированных клеток

Трансфекцию проводили при помощи реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen), не содержащего компонентов животного происхождения или при помощи липосомального реагента Unfectin-56 (Unifect Group, Россия) в бессывороточной среде CDDG-44 (Invitrogen), используя $1,5 \times 10^7$ клеток в 30 мл среды в колбе Эрленмейера, 18 мкг плазмидной ДНК и 15 мкл трансфекционного агента. Смешивание ДНК и трансфекционного реагента проводили по методике производителя агента. Культуру клеток выращивали 48 ч без смены среды, после чего отбирали аликвоту культуральной жидкости для определения концентрации ФСГ по ИФА.

Трансфекцию методом электропорации проводили в кюветах с щелью 4 мм с использованием гипотонического раствора для электропорации (Bio-Rad, США); в каждой реакции использовали 30 мкг линеаризованной плазмидной ДНК на $1,5 \times 10^7$ клеток. Для контроля эффективности трансфекции к плазмидной ДНК добавляли суперскрученную плазмиду pGFP-C2 (5% от общей массы плазмид). Трансфекцию проводили прямоугольным импульсом 200 В, 20 мс, аппарат Gene Pulser Xcell (BioRad). Клетки переносили в 30 мл среды ProCHO 5 (Lonza, Швейцария) с добавлением 8 мМ L-глутамина в колбе Эрленмейера, культивировали в течение 48 ч без смены среды, после чего микроскопически определяли долю трансфицированных клеток, экспрессирующих eGFP. Эффективность трансфекции составила 18% . Через 48 часов после трансформации культуру разделили на три равные порции (по 4×10^6 клеток) и культивировали отдельно в колбах Эрленмейера как

описано выше с добавлением различных концентраций селекционного агента метотрексата (0,5 мкМ, 1 мкМ и 2 мкМ).

3.3.2. Получение стабильно трансфицированных клеток

После трансфекции клетки культивировали в течение 48 ч без смены среды, затем переносили в селективную среду CD OptiCHO (Invitrogen), не содержащую нуклеозидов, и культивировали до тех пор, пока доля живых клеток не достигала 90% (10–20 дней). Во время культивирования в селекционной среде клетки пассировали 1 раз в 3 дня или до достижения концентрации живых клеток 3×10^5 клеток/мл. Уровень секреции фVIII определяли через 48 ч после начала трансфекции и по окончании культивирования в селективной среде. Трансфекции клеток каждой плазмидой проводили независимо по 3 раза в одинаковых условиях. Поликлональную популяцию клеток (пул), показавшую максимальную продукцию фактора VIII, использовали для амплификации бицистронной генетической кассеты *FVIII-dhfr* под действием метотрексата (MTX).

3.3.3. Создание моноклональных линий-продуцентов

Отобранный пул стабильно трансфицированных клеток культивировали в присутствии возрастающих концентраций MTX в среде CD OptiCHO с 8 мМ *L*-глутамин. На каждом шаге амплификации клетки культивировали в присутствии MTX в течение 10 дней, а затем еще 4–15 дней до достижения доли живых клеток более 90%. Концентрацию секретированного фVIII измеряли при помощи ИФА по окончании каждого шага амплификации, после чего вдвое увеличивали концентрацию MTX и повторяли процедуру еще 9 раз. Пул клеток-продуцентов с максимальным уровнем секреции фVIII использовали для получения клональных линий-продуцентов методом предельного разведения (0.5 клеток/лунка). Клетки клонировали в условиях адгезионного культивирования в среде CD CHO-A с 8 мМ аланил-глутамин (Invitrogen), по 200 мкл среды в каждую лунку планшета при 37°C, 5% CO₂ в течение 21 дня. MTX не включали в состав среды при клонировании и не использовали при дальнейшем культивировании.

Рост одиночных колоний наблюдали и документировали на 10-й и 14 дни культивирования. Выросшие колонии переносили в 48-луночные планшеты и при помощи ИФА осуществляли скрининг кондиционированной среды из лунок, содержащих активно растущие колонии. Клональные линии с наилучшими уровнями секреции продолжали растить в адгезионной культуре и затем реадаптировали к условиям суспензионного культивирования в течение трех последовательных пассажей в лунках 24-, 12- и 6-луночных

планшетов, используя среду CD OptiCHO с 8 мМ *L*-глутамина. При помощи ИФА проводили скрининг кондиционированной среды из лунок 6-луночных планшетов. Одну выбранную линию продолжали последовательно пассировать в 3, 15, 100 и 200 мл среды CD OptiCHO.

Препаративное культивирование вели в колбах Эрленмейера вместимостью 500 мл, по 200 мл культуральной среды на колбу. Клетки засеивали в концентрации 2.5×10^5 клеток/мл, культивировали без замены среды до плотности 3×10^6 клеток/мл (4–5 дней), а затем в течение еще 3 дней с ежедневным добавлением 4 мМ *L*-глутамина и 3 мМ глюкозы. Клетки и клеточный дебрис отделяли от кондиционированной среды центрифугированием (500 g, 5 мин) с последующей фильтрацией супернатанта при помощи капсульного фильтра с порами 0.22 мкм (Millipore). Осветленную среду хранили замороженной до использования.

3.3.4 Клонирование методом предельных разведений

Клонирование осуществляли методом предельных разведений (2; 1; 0,5 клеток на лунку) в 96-луночных планшетах, по 200 мкл среды на лунку в культуральной среде EXCELL-CHO (Sigma, США), с добавлением 8 мМ глутамина, 2 мМ гипоксантина (Gibco, США) и 2 мМ тимидина (Gibco, США) при 37°C, 5% CO₂. Планшеты инкубировали в течение 22 дней, после чего отмечали лунки с единственными колониями и продолжали инкубацию в течение еще 7 дней.

3.3.5. Получение клональных продуцентов фИХ

Культивирование клеток CHO DG44, трансфекцию плазмидой p1.1-F9 и первичную селекцию с 200 нМ метотрексата (MTX) и 8 мМ глутамина проводили как указано выше. Клонировали полученную популяцию клеток методом предельных разведений (1 клетка на лунку) в среде EX-CELL® CHO Cloning Medium (Sigma-Aldrich) с добавлением 8 мМ глутамина и без MTX. Определение продуктивных клонов проводили методом ИФА, отобранные клоны последовательно переносили в 24-х луночные планшеты, затем в 6-луночные планшеты с культуральной средой ProCHO 5 (Lonza, Швейцария) с 8 мМ глутамина и переводили в суспензионный режим культивирования. Среди клональных культур, не потерявших жизнеспособность в условиях суспензионного культивирования, отбирали по ИФА наиболее продуктивные. Для дальнейшей амплификации использовали клон p1.1-F9-T2/S.

Амплификацию проводили в колбах Эрленмейера с 30 мл среды ProCHO с 8 мМ глутамина с добавлением 1, 2, 4 мкМ MTX до восстановления жизнеспособности клеток выше 85% в течение 15-20 дней. Культуру клеток, полученную в присутствии 4 мкМ MTX с наибольшей удельной продуктивностью использовали для второго клонирования методом предельных

разведений, отобранный клон 3B12 был реадаптирован для суспензионного культивирования в среде ProCHO 5 и использован для последовательной ко-трансфекции линейаризованных плазмид p1.2-Hyg-Fur и p1.2-Zeo-VKORC. Селекцию стабильно трансфицированных популяций проводили при помощи антибиотиков гигромицина Б и зеоцина, соответственно. Полученная поликлональная популяция 3B12-FurVC была использована для окончательного клонирования методом предельных разведений, как описано выше. Полученные клоны были последовательно разделены на группы по уровню экспрессии растворимого PACE/Furin и уровню прокоагуляционно активного фИХ. Отобранные клоны были повторно адаптированы к среде ProCHO 5 с 8 мМ глутамина и 1 мкМ витамина К3 (менадион сульфат, Sigma-Aldrich) и суспензионному культивированию в колбах Эрленмейера.

3.3.6. Получение стабильно трансфицированных популяций клеток при использовании пар векторов с маркерами устойчивости DHFR и GS.

Трансфекцию проводили на аппарате Neon (Invitrogen), используя установки 1700 В, 1 импульс 20 мс, набор для нуклеофекции Invitrogen Neon (Invitrogen) и по 9 мкг линейаризованной плазмидной ДНК на 1×10^6 клеток. При проведении трансфекций плазмид, не кодирующих флуоресцентные белки для контроля эффективности трансфекции к целевой ДНК добавляли по 1,5 мкг сверхскрученной плазмиды pCMV-EGFP-N2, кодирующей зеленый флуоресцентный белок под контролем вирусного промотора CMV. Клетки культивировали в течение 48 ч без смены среды, после чего микроскопически определяли долю трансфицированных клеток, экспрессирующих eGFP, и уровень секреции ЛГ методом ИФА, либо микроскопически оценивали долю клеток, экспрессирующих красный флуоресцентный белок и переводили в среду для селекционного культивирования, не содержащую гипоксантина, тимидина и глутамина и дополнительно содержащую 200 нМ метотрексата (Sigma-Aldrich) и 50 нМ метионилсульфоксимиона (Sigma-Aldrich). Вели культивирование в течение 20-30 дней до восстановления жизнеспособности более 85% клеток, заменяя культуральную среду на 90% каждые 3-4 дня.

3.4. Методы анализа продуцентов

3.4.1. Выделение геномной ДНК

Геномную ДНК выделяли набором «Wizard SV Genomic DNA Purification System» (Promega) по инструкции производителя. Если не указано иное, то использовали 2 млн клеток CHO для выделения, концентрацию выделенной ДНК измеряли при помощи флуориметра Qubit и набора Qubit DNA HS Assay Kit (Invitrogen) расчет концентрации

проводили при помощи внешнего стандарта, предварительно охарактеризованного по УФ-спектрофотометрии.

3.4.2. Выделение РНК и получение кДНК

Суммарную РНК выделяли из 0,5-5 млн клеток, предварительно замороженных в жидком азоте, с помощью набора реагентов RNeasy Plus Mini Kit («Qiagen», США) по методике производителя. Концентрацию РНК определяли УФ-спектрофотометрией. Для дальнейшей работы использовали только такие образцы РНК, для которых соотношение A260/A280 составляло 1.8–2.0. Целостность выделенной РНК проверяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

Для приготовления амплифицированных образцов кДНК использовали по 1 мкг суммарной РНК, предварительно обработанной ДНКазой I («Invitrogen»), свободной от РНКаз, а также набор реактивов Mint (Евроген), включающий олигоdT праймеры.

3.4.3. ПЦР в реальном времени

Количественный анализ копийности экспрессионной кассеты в геноме и уровня мРНК проводили методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием амплификатора iCycler iQ (Bio-Rad, США) и готовой реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген), содержащей интеркалирующий краситель SYBR Green I. Каждую реакцию повторяли 3 раза в объеме 25 мкл, в 3-5 повторах.

Праймеры для ПЦР-РВ подбирали программой Beacon Designer v7.51, проверяли на специфичность при помощи NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Данные ПЦР-РВ обрабатывали в программе iCycler Iq4, включая расчет эффективности реакций.

Для абсолютной калибровки использовали экспрессионные векторы p1.1-F8BDD – в случае продуцента фактора VIII, p1.1-FIX – для продуцента фактора IX, p1.1-FSH-A1B – в случае продуцента ФСГ, p1.1-LHA и p1.1-LHB в случае продуцента ЛГ или генетические конструкции, содержащие фрагменты последовательностей контрольных генов. Используя данные о последовательности конструкций, при помощи онлайн калькулятора <http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php> определяли число копий в единице объема. Для калибровочной кривой готовили серийные разведения стандартов (от 10^3 до 10^7 копий на реакцию) и отрицательные контроли (образцы без ДНК). Каждый образец исследовали в 3-5 повторностях. Калибровочную кривую (зависимости порогового цикла от логарифма числа

копий молекул стандарта) с определением эффективности реакции строили с помощью программы прибора iCycler. Использовали праймеры, не гомологичные последовательностям китайского хомячка (к мутированной области фVIII, к области IRES-DHFR, к OPC синтетических генов).

Результаты ПЦР сравнивали с результатами для контрольного ампликона, представленного в геноме клеток CHO только один раз, по поисковой выдаче алгоритма BLAST из базы данных NCBI Nucleotide Collection.

Для расчета уровня экспрессии мРНК использовали относительный $\Delta\Delta C_t$ метод для праймеров с известной эффективностью ПЦР. Относительное увеличение уровня экспрессии гена в раз, нормированного по контрольному гену, определяли по формуле (1) или, в случаях, когда эффективность ПЦР не определялась или была близка к единице, по формуле (2).

$$\text{Увеличение, раз} = (2 \times \text{Эффективность ПЦР})^{\Delta\Delta C_t} \quad (1)$$

$$\text{Увеличение, раз} = 2^{\Delta\Delta C_t} \quad (2), \text{ где}$$

$$\Delta\Delta C_t = [(Ct_{G.O.I.Ctrl} - Ct_{HK.G.Ctrl}) - (Ct_{G.O.I.Prod} - Ct_{HK.G.Prod})] \quad (3), \text{ где}$$

$Ct_{G.O.I.Ctrl}$ - пороговый цикл для исследуемого гена для контрольной линии, $Ct_{HK.G.Ctrl}$ - пороговый цикл для контрольного гена для контрольной линии, $Ct_{G.O.I.Prod}$ - пороговый цикл для исследуемого гена для линии-производителя, $Ct_{HK.G.Prod}$ - пороговый цикл для контрольного гена для линии-производителя.

Праймеры для оценки копийности экспрессионной кассеты в геноме и уровня мРНК приведены в (Таб. 8)

Таблица 8. Праймеры для оценки копийности экспрессионной кассеты в геноме и уровня мРНК методом ПЦР-РВ

Праймеры для RT-ПЦР		
Мишень	Название	Последовательность 5' - 3'
eGFP	RT-GFP-F	GCACCATCTTCTTCAAGG
	RT-GFP-R	TTGTGGCTGTTGTAGTTG
Hyg	RT-HYG-F	TTCGGCTCCAACAATGTC
	RT-HYG-R	GTCTGCTGCTCCATACAAG
Neo	RT-Neo-F	CCGTGATATTGCTGAAGAG
	RT-Neo-R	GTCAAGAAGGCGATAGAAG
Zeo	RT-Zeo-F	AGTTGACCAGTGCCGTTCC
	RT-Zeo-R	GGCGAAGTCGTCCTCCAC
IRES-DHFR	RT-ID-F	GCCACAAGATCTGCCACCATG

	RT-ID-R	GTAGGTCTCCGTTCTTGCCAATC
FVIII-BDD	RT-BDD-F	GACAAGAACACTGGTGATTATTAC
	RT-BDD-R	CGAGTTATTTCCCCTTGATGG
FIX	RT-F9-f	TTAGATGTAACATGTAACATTAAGAAT GGCAG
	RT-F9-r	CATTAATGATTGGGTGCTTTGAG
фурин	RT-FURC-F	AGCGGGACCTGAATGTGAAG
	RT-FURC-R	GGTGGTTCTTCTCGATGCCA
cVKOR	RT- cVKOspN-F	AACGGGTTTGCCGTCAGAAC
	RT- cVKOspN-R	CGGTAATCCTCGTCTCGG
	RT- cVKOspC-F	GGGCTTGATGTTGCTTAATTTC
	RT- cVKOspC-R	GCAGGTGTTAGGGGTAATATG
hVKOR	RT-hVKOR-f	TGACGGGCTTAGTGCTCTCG
	RT-hVKOR-r	GATTGAGGATGCTGTCCTGTCC
FSH	SQ-FA-F	CACGCTACAGGAAAACCC
	SQ-FB-F	GCCCCAAAATCCAGAAAAC
	SQ-FA-R	TCTTGGACCTTAGTGGAGTG
	SQ-FB-R	ACAATCAGTGCTGTCGCT
LH	RT-LH-F	GCCTCTTGCTCTTACTTCTAC
	RT-LH-R	AATTGTGGTATTGACTGTTATGC
mCherry	RT-CHE-F	CGACGCTGAGGTCAAGAC
	RT-CHE-R	TGTTCCACGATGGTGTAGTC
GS	RT-GS-F	CGCCAGTATCCGCATTCC
	RT-GS-R	TTCCGTCACCCGCATAGGG
Гены домашнего хозяйства CHO		
EiF1a1- фактор инициации трансляции 1A эукариот	RT-EiF1a1-F	CCGTCAGAACGCAGGTGTTG
	RT-EiF1a1-R	GTGGTGGACTTGCCCTGAATCTAC
EiF3- фактор инициации трансляции 3 эукариот*	RT-EiF3-F	CCACAACCTCCACCAGGATT
	RT-EiF3-R	ATGCGGACGTAACCATCTTC
PPIB- пептидил-пролил изомеразы В (циклофилин В)	RT-PPIB-F	GCAGGCAAAGACACCAATG
	RT-PPIB-R	CTCCACCTTCTCACTACATC
BIP –иммуноглобулин-связывающий белок (Grp78)	RT-BIP-F	ACTGCTTGATGTATGTCCTCTTAC
	RT-BIP-R	TGTTAGGGGTCGTTACCTTC
OSTC- субъединица комплекса олигосахарилтрансферазы	RT-OSTC-F	CCTGGATTGGCTCCTGTTAG
	RT-OSTC-R	TTACTCTGCTCTTCACTCTTCTC
St3gal –бетагалактозид-2,3-сиалил трансфераза III	RT-St3gal3-F	GCGGGAGTCAACAAGAGTAG
	RT-St3gal3-R	ACATGACTTTGACAAACTGACC
B4gal - бета-1,4-галактозилтрансфераза I	RT- Beta4galt1-F	TCAACATAGGCTTCCAAGAGG
	RT- Beta4galt1-R	AGGCAGGCTAAACCCAAAC
bACT – бета актин *	RT-bACT-F	GCTCTTTTCCAGCCTTCTT
	RT-bACT-R	GAGCCAGAGCAGTGATCTCC
RAB - GTP-аза Rab	RT-RAB-F	GAG TCC TAC GCT AAT GTG AAA C
	RT-RAB-R	TTC CTT GGC TGT GGT GTT G

*- Праймеры согласно [268], Сокращения – Tm - температура отжига; IRES-DHFR область IRES и гена дигидрофолатредуктазы мыши, FVIII-BDD – OPC гена FVIII-BDD, область SQ делеции В-домена, гены китайского хомячка: BIP – ген иммуноглобулин-связывающего белка (Grp78); St3gal3 –ген бетагалактозид-2,3-сиалил трансферазы III, EiF3-ген фактора инициации трансляции 3 эукариот, PPIB- ген пептидил-пролил изомеразы В

(циклофилина В), Eif1a1- ген фактора инициации трансляции 1А эукариот, OSTC- ген субъединица комплекса олигосахарилтрансферазы, Beta4galt1- ген бета-1,4-галактозилтрансферазы 1, bACT- ген β - актина, GADPH- ген глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы

3.4.4. Саузерн-блот гибридизация

Саузерн-блот гибридизацию проводили с использованием набора реагентов для введения биотиновой метки в ДНК «Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit» (Fermentas). В качестве матрицы для получения зондов использовали плазмиду pAL-ID (содержащую общие с экспрессионными плазмидами p1.1 области начала репликации, гена бета-лактамазы, EMCV IRES, OPC DHFR), либо ПЦР-продукт, соответствующий фрагменту OPC фVIII. Геномную ДНК рестрицировали эндонуклеазой *EcoRI* в течение 16 часов, пересаждали спиртом, разделяли в 0,8% агарозном геле. Подготовку геля и перенос на мембрану Hybond-N+ (GE Healthcare, США) проводили по протоколу производителя мембраны, в буфере с высокой ионной силой 20x SSC (3 М NaCl, 0,3М Na₃C₆H₅O₇ x 5,5H₂O) в течение 16 часов. ДНК фиксировали нагреванием мембраны 80°C 2 часа. Прегибридизацию и гибридизацию вели по [267] в буфере 7% SDS, 0.5 М Na₂PO₄, pH 7.2, 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) 16 часов при 65°C. Отмывки проводили по протоколу производителя мембраны, детекцию вели набором Biotin Chromogenic Detection Kit (Fermentas). Саузерн-блот гибридизацию проводили с использованием набора реагентов для введения радиоактивной метки в ДНК, DecaLabel™ и Набора реагентов для хромогенного детектирования биотинилированной ДНК (Fermentas, Литва).

В случае исследования линий клеток-продуцентов фIX биотиновую метку вводили в ДНК зонда при помощи набора «Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit» (Fermentas). В качестве матрицы для получения зондов использовали плазмиду pAL-ID, содержащую общие с экспрессионными плазмидами p1.1 области начала репликации, гена бета-лактамазы, EMCV IRES, OPC DHFR, либо продукт амплификации плазмиды p1.1-F9 с праймеров AD-9-AbsF и AD-9-NheR, соответствующий OPC фIX. Геномную ДНК для блоттинга рестрицировали эндонуклеазой *ApaI* в течение 16 часов. Остальные операции вели как указано выше.

3.4.5. Иммуноферментный анализ

Определение фVII методом ИФА вели при помощи поликлональных антител мыши, полученных как указано в разделе Получение антител и используемых в качестве подложки, а также биотинилированных моноклональных антител мыши, нечувствительных к присутствию ионов кальция и стрептавидин-пероксидазы.

ИФА для всех вариантов фVIII проводили согласно [269]. ИФА в режиме «связывание антител» использовали для тестирования моноклональных антител (мкАт) к фVIII, антигеном служил концентрат фVIII из донорской плазмы (любезно предоставленный А.Л. Берковским, Гематологический научный центр МЗСР РФ) в количестве 200 нг/лунка в PBS. При измерении концентрации фVIII, секретированного в культуральную среду, в качестве подложки использовали поликлональные антитела к фVIII («LifeSpan BioSciences», США) в количестве 50 нг/лунку; в качестве специфичного антитела - мкАт А2, описанное в разделе «Результаты». В качестве стандарта использовали пулированную донорскую плазму в последовательных разведениях в PBS с 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Тестируемые образцы вносили в лунки без разведения или разведенные в PBS с 1% БСА.

В случае фIX в качестве иммобилизованного антитела использовали поликлональные антитела кролика к фIX («LifeSpan BioSciences», США) в количестве 50 нг/лунку; в качестве специфичного антитела моноклональные антитела мыши НIX-1 (F2645, Sigma-Aldrich). Тестируемые образцы вносили в лунки без разведения или разведенные в PBS с 1% БСА. Определение доли молекул фIX с неотделенным пропептидом проводили при помощи ИФА, используя в качестве иммобилизованных антител аффинно очищенные антитела кролика, полученные к синтетическому пептиду, соответствующему пропептиду фIX человека, как описано в [270], остальные шаги и проводили, как указано выше.

Концентрации ФСГ в культуральной среде и в полуочищенном продукте определяли при помощи набора производства компании DRG Instruments GmbH, Германия (кат. номер EIA-1288). Разведения исследуемых растворов вели при помощи фосфатно-буферизованного раствора с 1% бычьего сывороточного альбумина.

Иммуноферментный анализ для определения концентрации ЛГ проводили по схеме sandwich ELISA. В качестве калибратора использовали препарат Луверис (Мерк Сероно, Италия) с начальной концентрацией 4 нг/мл. Использовали мышинные моноклональные антитела против β -ЛН в PBS pH 7,2 (Хема-Медика, Россия), и конъюгат моноклонального антитела против α -субъединицы ЛГ, ХГч, ФСГ, ТТГ с пероксидазой хрена в PBS pH 7,2.

3.4.6. Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ)
Электрофорез проводили по стандартной методике Лэммли с использованием прибора для вертикального электрофореза и переноса белков на мембрану MiniVE (Amersham Biosciences, США).

Готовили двухкомпонентный гель следующего состава: 1) верхний гель – 5 % смеси акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0,1 % ДСН, 0.125 М Трис–HCl, pH 6.8; 2) нижний гель – 14% или 18 % смеси акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1 %

ДСН, 0.375 М Трис–HCl, рН 8.9. Перед полимеризацией добавляли персульфат аммония до 0.0001%. и N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин до концентрации 0.00005%. Электродный буфер для электрофореза по Лэммли 5X: глицин 72 г/л ДСН 5 г/л, трис–HCl 6.5 г/л, рН 8.3. Буфер образца 2x: 5% 2-меркаптоэтанола, 4% ДСН, 0,25М Трис–HCl, рН 6.8; 4мМ ЭДТА-Na, рН 8,0, 10% глицерина, 0,25мг/мл бромфенолового синего. Образцы белков смешивали с буфером образца в соотношении 1:1, прогревали 5 мин при 100° С, наносили на гель и вели электрофорез при силе тока 10 мА на 1 пластину геля до перемещения красителя в нижний гель, после чего силу тока увеличивали до 15-20 мА на 1 пластину геля и вели электрофорез до момента выхода краски. Отделяли разделяющий гель, который затем окрашивали коллоидным раствором Кумасси синим R-250 (Fermentas, Литва) по методике производителя. Денситометрию проводили на планшетном компьютерном сканере с последующим анализом оцифрованной электрофореграммы при помощи программы TotalLab v2.01. (Nonlinear Dynamics, ltd., США).

3.4.7. Количественное определение белка

Количественное определение белка проводили наборами QuantiPro™ BCA Assay Kit (Sigma, США) или Quant-iT™ Protein Assay Kit (Invitrogen, США) или спектрофотометрически.

Количественное определение ФСГ в исследуемых образцах очищенного препарата проводили с помощью метода разделительной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разделение гетеродимера, его олигомеров и субъединиц осуществляли на колонке Superdex 75 HP SEC и детектировали при 210 нм. Хроматографию проводили в растворе, содержащем 80% 0,2М фосфата натрия рН 7,0 и 20% ацетонитрила на скорости 0,4 мл/мин при комнатной температуре. Колонку уравнивали примерно 10 объёмами несущего раствора до полной стабилизации базовой линии. Далее в систему дважды вводили раствор плацебо, дважды - раствор стандарта ФСГ, и дважды - исследуемый раствор. Объём всех проб – 20 мкл. Ориентировочные времена удерживания: гетеродимер ФСГ - 24 минуты, олигомеры - 18-20 минут, субъединицы – 28 минут. Содержание в исследуемом растворе гетеродимера ФСГ, олигомеров и субъединиц рассчитывали по площади пиков.

3.4.8. Иммуноблоттинг

Лизаты клеток получали при помощи модифицированного буферного раствора RIPA (50 мМ Трис–HCl, рН 7.4; 1% NP-40; 0.25% деоксихолата натрия, 150 мМ NaCl, 1 мМ Na-ЭДТА), содержащего смесь ингибиторов протеаз (Sigma, США). Образцы кондиционированной среды осветляли центрифугированием и концентрировали в 30 раз

пересаживанием трихлоруксусной кислотой в случае исследования фVIII или использовали без дополнительной подготовки в остальных случаях. Образцы внутриклеточного тотального белка нормировали по концентрации суммарного белка, вносили в лунки из расчета 10 мкг белка на лунку и разделяли электрофорезом в 7.5% денатурирующем полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ). Перенос на мембрану, блокирование, гибридизацию и проявление окраски проводили согласно [269]. Использовали мембрану Hybond C Extra (GE Healthcare, США), готовый раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (Sigma), мкАт А2 для детекции тяжелой цепи фVIII и мкАт производства Santa Cruz, США для детекции легкой цепи.

В случае фIX в качестве иммобилизованного антитела использовали поликлональные антитела кролика к фIX («LifeSpan BioSciences», США) в количестве 50 нг/лунку; в качестве специфичного антитела моноклональные антитела мыши НIX-1 (F2645, Sigma-Aldrich). Тестируемые образцы вносили в лунки без разведения или разведенные в PBS с 1% БСА. Определение доли молекул фIX с неотделенным пропептидом проводили при помощи ИФА, используя в качестве иммобилизованных антител аффинно очищенные антитела кролика, полученные к синтетическому пептиду, соответствующему пропептиду фIX человека, как описано в [270], остальные шаги и проводили, как указано выше.

Иммуноблоттинг для ФСГ проводили при помощи конъюгата моноклональных антител к альфа-субъединице гонадотропных гормонов с пероксидазой хрена (Хема-Медика, РФ, кат. # K203) или моноклонального антитела мыши против бета-субъединицы ФСГ (кат # ab47161, Abcam, Великобритания), остальные шаги проводили, как указано выше.

3.4.9. Изоэлектрическое фокусирование

Процедуры производили в соответствии с инструкциями производителя прибора для изоэлектрического фокусирования Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare, США). ИЭФ осуществляли с использованием готовых гелей pH 3-7 (GE Healthcare, США). 40 мкг очищенного обессоленного препарата ФСГ помещали в буфер, содержащий 8М мочевины, 2% CHAPS и 0,5% IPG-буфер. В случае денатурирующего ИЭФ в раствор добавляли DTT до 0,2 М. Гели регидратировали в присутствии исследуемого препарата в течение двух часов без напряжения и в течение 10 часов при напряжении 50 V. Изоэлектрическое фокусирование проводили при постепенном повышении напряжения до 8000V и поддержании данного значения напряжений до достижения 56000 В*ч. Гель фиксировали в течение часа в присутствии 12,5% ТХУ и 30% метанола, промывали один раз очищенной водой и окрашивали Bio-Safe Coomassie G-250 Stain (Bio-Rad, США). Все процедуры проводились при перемешивании в гибридизаторе Micro-4 (Hybaid, США).

3.4.10. Коагулометрия

Прокоагуляционную активность фVIII определяли при помощи оптического коагулометра ThromboScreen 400c (Pacific Hemostasis, США) и набора реагентов «Фактор VIII-тест» (НПО Ренам, Россия) в соответствии с протоколом производителя набора с некоторыми изменениями. Образцы культуральной среды разводили перед проведением анализа имидазоловым буферным раствором, элюаты с аффинных колонок разводили в 10–50 раз имидазоловым буферным раствором с 1% БСА. При тестировании образцов культуральной среды к образцу калибровочной плазмы крови добавляли 10% кондиционированной среды, полученной на культуре нетрансфицированных клеток. При тестировании элюатов к образцам калибровочной плазмы крови добавляли 2–10% раствора для элюции.

Прокоагуляционную активность фIX определяли методом активированного частичного тромбопластинового времени при помощи «фактор IX – тест» производства НПО «Ренам» (Москва). В качестве стандарта активности использовали рекомбинантный фIX в составе лекарственного средства «Benefix» (Wyeth, США). Измерения проводили при помощи оптического коагулометра ThromboScreen 400c (Pacific Hemostasis, США).

3.4.11. Ферментативная кинетика

Измерение активности фурина проводили при помощи пептидного субстрата с отделяемой группой 7-амино 4-метилкумарина Pyr-Arg-Thr-Lys-Arg-AMC (344935, «Merck Millipore», США) по [270].

Измерение активности VKORC1 с использованием ДТТ в качестве донора электронов проводили по методике по [271], синтез и очистку субстрата ферментативной реакции - 2,3-эпоксид витамина K1 (K[>]O) проводили из хиноновой формы витамина K1 («Sigma Aldrich», США) по [272].

3.4.12. Измерение концентрации флуоресцентных белков и проточная цитофлуориметрия

Около 1 млн клеток осаждали из культуральной суспензии центрифугированием на 300 g, ресуспендировали в исходном объеме ФБР и повторно осаждали центрифугированием. Промытый осадок клеток ресуспендировали в 100 мкл раствора для лизиса, включающего 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl при pH=7.5, 1% Triton X-100, смесь ингибиторов протеаз

(Sigma), и инкубировали 30 мин на льду при помешивании. Нерастворимые компоненты клеток и хроматин удаляли центрифугированием при 9000 g в течение 10 мин. Концентрацию eGFP в лизате клеток, используемом в дальнейшем в качестве стандартного раствора eGFP, определяли спектрофотометрией $\lambda=488$ нм, использовали коэффициент экстинкции $55,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ и молекулярную массу eGFP 32.7 кДа [273]. Интенсивность флуоресценции eGFP в остальных исследованных лизатах определяли в сравнении с калибровочной кривой, построенной для серийных разведений охарактеризованного спектрофотометрией стандарта. Концентрацию общего белка определяли по Бредфорд, использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (Sigma) в качестве стандарта. Стандарт интенсивности флуоресценции для mCherry получали аналогично стандарту eGFP, использовали коэффициент поглощения 2,57 О.Е. $\lambda=587$ нм для раствора 1 мг/мл, согласно данным [274]. Использовали микропланшетный флюориметр с монохроматором Varioscan (Thermo Fisher Scientific), ширина щели 5 нм, длины волн поглощения/эмиссии 488/587 нм и 507/610 нм для eGFP и mCherry, соответственно.

Для проведения проточной цитофлуориметрии неразбавленные образцы культуральных суспензий анализировали при помощи цитофлуориметра FACS FC 500 (Beckman Coulter), используя источник света с длиной волны 488 нм и светофильтр детекции 530/40-нм. Было проанализировано не менее 10,000 клеток для каждого образца.

3.4.13. Модификации состава культуральной среды при культивировании линии-продуцента фVIII

Влияние солей алкановых кислот на концентрацию фVIII изучали для простого периодического культивирования в перемешиваемых колбах, посевная плотность 375 тыс. клеток/мл, время культивирования – 3 дня, если не указано иное. Растворы 0,2 М пропионата и бутирата натрия доводили соляной кислотой до pH=7,2 перед стерильной фильтрацией. 2/4-трет-бутил-4-метоксифенол (бутил-гидроксианизол, ВНА) растворяли в ДМСО и добавляли к культуральной среде в конечной концентрации 0,1 мМ. Добавление дихлорометил-2',7'-дихлоро-дигидрофлюоресцеин ацетата (H2-DCF-DA, DCF) и последующий анализ проточной цитофлуориметрией проводили, как указано в [275] с некоторыми изменениями. Отбирали образцы для окраски и анализа через 3-4 дня после посева, конечная концентрация DCF 5 мкМ, окрашивание 20 мин на льду, окрашивание ядер пропидиййодидом, конечная концентрация 1,5 мкМ. Анализ выполняли при помощи прибора Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США), гейтирование проводили по рассеянию света FS/SS, используя в качестве образца для установки гейтов популяцию интактных

клеток. Вторичное гейтирование проводили по уровню флуоресценции пропидийиодида (620 нм). Уровень образования активных форм кислорода (reactive oxygen species, ROS) определяли как интенсивность флуоресценции активированного DCF, 525 нм. Анализировали не менее 100 тыс. клеток (после гейтов) для каждого исследованного образца, распределение клеток по интенсивности флуоресценции в этом канале было одnogорбым во всех случаях. Опорные значения уровня генерации ROS были определены для популяции интактных клеток, к которым непосредственно перед окрашиванием DCF была добавлена H_2O_2 до конечной концентрации 10 мкМ, 100 мкМ, 1000 мкМ

3.5. Очистка и характеристика продуктов

3.5.1. Хроматографическая очистка фVIII

Хроматографическую очистку фVIII из супернатанта клеточной культуры проводили при помощи последовательных стадий мультимодальной хроматографии, катионообменной хроматографии, аффинной хроматографии, анионообменной хроматографии и гель-фильтрации по патентной заявке PCT WO2009156430A1 с изменениями.

К кондиционированной культуральной среде или суспензии клеток-продуцентов добавляли 0,3 М NaCl и 27 мМ CaCl₂, инкубировали при перемешивании 30 мин, отделяли клетки и дебрис центрифугированием, добавляли L-гистидин pH=7,0 до 10 мМ и Твин-80 до 0,02% и наносили осветленный супернатант порциями до 100 мл (нагрузка до 10 тыс. МЕ/мл) на колонку HiTrap объемом 1 мл с сорбентом Capto MMC (GE Healthcare, США), предварительно уравновешенную раствором 1-A, содержащим 0,3 М NaCl, 0,01 М CaCl₂, 0,01 М L-гистидин, 0,02% Твин-80, pH=7,0. Нанесение вели на скорости 1 мл/мин. Удаляли примесные белки последовательными промывками колонки 10 мл растворов 1-B, 1-C, 1-D на скорости 2 мл/мин. Раствор 1-B содержал 1 М NaCl, 0,05 М CaCl₂, 0,05 М L-гистидин, 0,02% Твин-80, pH=6,5. Раствор 1-C содержал 0,1 М NaCl, 0,05 М CaCl₂, 0,05 М L-гистидин, 0,02% Твин-80, pH=6,5. Раствор 1-D содержал 0,3 М NaCl, 0,01 М CaCl₂, 0,01 М L-гистидин, 0,25 М L-аргинин гидрохлорид, 10% этиленгликоль, 0,02% Твин-80, pH=6,5. Элюцию целевого белка вели при обратном направлении потока на скорости потока 1 мл/мин и остановкой потока на 10 мин при помощи раствора 1-E, содержащего 0,3 М NaCl, 0,02 М CaCl₂, 0,02 М L-гистидин, 0,8 М L-аргинин гидрохлорид, 50% этиленгликоль, 0,02% Твин-80, pH=6,5. Собирали около 5 мл раствора.

Элюированный раствор фVIII разбавляли раствором 2-A, содержащим 0,01 М NaCl, 0,01 М L-гистидин, 0,01 М CaCl₂, 0,02% Твин-80, pH=6,5 в 8 раз до проводимости менее 12 мС/см. Колонку объемом 1 мл, содержащую сорбент SP Sepharose FF (GE Healthcare, США),

уравновешивали раствором 2-В, содержащим 0,15 М NaCl, 0,01М L-гистидин, 0,01 М CaCl₂, 0,02% Твин-80, рН=6.5. Наносили разбавленный раствор фVIII на скорости 2 мл/мин, используя предельную емкость 10000 МЕ/мл сорбента. Удаляли слабо связавшиеся примесные белки промывкой колонки 20 мл раствора 2-В и элюировали фVIII раствором 2-С, содержащим 0,34 М NaCl, 0,035М CaCl₂, 0,045 М L-аргинин гидрохлорид, 0,2 М сорбитола, 0,01 М L-гистидин, 0.02% Твин-80, рН=6,5. При элюции использовали обратное направление потока раствора в колонке и остановку потока на 10 мин. Собирали 3-5 мл раствора фVIII. Пригодный для хранения раствор полуочищенного препарата фVIII немедленно замораживали и хранили перед дальнейшей очисткой при температуре ниже -20 оС.

Иммуноафинную очистку фVIII проводили при помощи колонки объемом 1 мл, содержащей сорбент VIIISelect (GE Healthcare, США). Колонку перед нанесением образца уравновешивали раствором 3-А, содержащим 0.3 М NaCl, 0.02 М CaCl₂, 0.02 М L-Гистидин, 0,02% Твин-80, рН=6,5. Размороженный раствор фVIII наносили на скорости 0,2 мл/мин, использовали предельную емкость колонки 20000 МЕ/мл. Колонку последовательно промывали на скорости 2 мл/мин 10 мл раствора 3-А и 30 мл раствора 3-В, содержащего 1 М NaCl, 0.02 М CaCl₂, 0.02 М L-Гистидин, 0,02% Твин-80, рН=6,5. Элюировали фVIII раствором 3-С, содержащим 1.5 М NaCl, 0.02 М CaCl₂, 0.02 М L-Гистидин, 0,02% Твин-80, 50% этиленгликоль, рН=6,5. При элюции использовали обратное направление потока раствора в колонке и остановку потока на 10 мин. Собирали 5 мл раствора фVIII.

Элюированный раствор фVIII разбавляли раствором 4-А, содержащим 0,01 М NaCl, 0,01М L-гистидин, 0,01 М CaCl₂, 0,02% Твин-80, рН=6.5 в 15 раз до проводимости менее 12 мС/см. Колонку объемом 1 мл, содержащую сорбент Q Sepharose FF (GE Healthcare, США), уравновешивали раствором 4-В, содержащим 0,1 М NaCl, 0,02 М L-гистидин, 0,02 М CaCl₂, 0,02% Твин-80, рН=6,5. Наносили разбавленный раствор фVIII на скорости 2 мл/мин, используя предельную емкость 25000 МЕ/мл сорбента. Удаляли примесные белки промывкой колонки 20 мл раствора 4-С, содержащего 0,3 М NaCl, 0,02 М L-гистидин, 0,02 М CaCl₂, 0,02% Твин-80, рН=6,5 и элюировали фVIII раствором 4-Д, содержащим 0,4 М NaCl, 0,02 М CaCl₂, 0,02 М L-гистидин, 0,02% Твин-80, рН=6,5. При элюции использовали обратное направление потока раствора в колонке и остановку потока на 10 мин. Собирали 1-2 мл раствора фVIII.

Гель-фильтрационную колонку Tricorn 10/300 Superdex 200 (GE Healthcare, США) уравновешивали раствором 5-А, содержащим 9 мг/мл NaCl, 0,25 мг/мл CaCl₂, 1,5 мг/мл L-гистидин, 0,01% Твин-80, 3 мг/мл сахарозы, рН=7,0 на скорости 1 мл/мин. Наносили раствор

фVIII в объеме до 2 мл и вели разделение форм фVIII на скорости 0,4 мл/мин. Собирали основной пик мономера фVIII в объеме 5-8 мл. Полученный раствор очищенного фVIII немедленно замораживали и хранили при температуре ниже -20 оС.

3.5.2. Выделение и очистка фIX

Проводили по следующей методике: кондиционированную культуральную среду наносили на колонку с сорбентом Capto MMC, уравновешенную раствором 20 мМ цитрата натрия, рН=7.0, 100 мМ NaCl, 0.02% Твин-80, промывали раствором с рН=6.5, содержащим 0. М NaCl, элюировали фIX раствором 20 мМ цитрата натрия, рН=6.5, 200 мМ NaCl, 0.5 М аргинина, 0.02% Твин-80. Элюат разбавляли в 4 раза водой и наносили на колонку с сорбентом Capto Q, уравновешенную раствором 50 мМ Tris-HCl рН=8.0; 100 мМ NaCl; промывали раствором 50 мМ Tris-HCl рН=8,0; 200 мМ NaCl и проводили ступенчатую элюцию растворами 50 мМ Tris-HCl рН=8.0; 10 мМ CaCl₂, 100-500 мМ NaCl. Фракции элюата, содержащие фIX с полной прокоагуляционной активностью, разбавляли водой в 2 раза и наносили на колонку с сорбентом Capto Heparin, уравновешенную раствором 50 мМ Tris-HCl рН=7.5; 100 мМ NaCl, промывали колонку раствором 50 мМ Tris-HCl рН=7,5; 200 мМ NaCl и элюировали фIX раствором 50 мМ Tris-HCl рН=7.5; 500 мМ NaCl. Раствор очищенного фIX концентрировали ультрафильтрацией при помощи кассеты VivaFlow 200 с мембраной 10 кДа PES (Sartorius Stedim, Германия) и переводили в раствор хранения, содержащий 8 мМ L-гистидина, 0.8% сахарозы, 208 мМ глицина, рН=7.2 и 0.004% Твин-80. Полученный раствор очищенного фIX разделяли на аликвоты, замораживали и хранили при температуре ниже -70°С.

3.5.3 Хроматографическая очистка ФСГ

Наработанную культуральную среду освобождали от клеток центрифугированием (2000 rpm, 10 мин, бакетный ротор, центрифуга Beckman J2-21) и проводили вирус-инактивацию, добавляя TNBP до 0,3% и Tween 80 до 1%. Инкубировали 6 ч при комнатной температуре, после чего рН полученной культуральной жидкости доводили до 5,5 с помощью концентрированной соляной кислоты. Закисленную среду центрифугировали (10000 rpm, 20 мин, центрифуга Sorvall Instruments RC5C) и наносили на колонку, содержащую 10 мл смолы Capto MMC, предварительно уравновешенную буфером, содержащим 50 мМ фосфат натрия рН 5,5 и 100 мМ NaCl. Нанесение осуществляли на скорости 5 мл/мин, промывали 20 объемами уравновешивающего буфера на скорости 10 мл/мин. Элюцию осуществляли на

скорости 10 мл/мин 10 объёмами буфера, содержащего 50мМ Tris pH 7,5 и 150 мМ NaCl, предварительно перевернув колонку.

ФСГ-содержащие фракции, полученные после хроматографии на Capto MMC объединяли и наносили на колонку с 10 мл смолы Capture Select FSH-Affinity Matrix, предварительно уравновешенную буфером, содержащим 20 мМ Tris pH 7,5 и 150 мМ NaCl на скорости 2,5 мл/мин. Промывку осуществляли на скорости 10мл/мин 10 объёмами уравновешивающего буфера и на скорости 5 мл/мин 5 объёмами раствора, содержащего 20 мМ Tris pH 7,5 и 0,5М NaCl. Элюцию осуществляли на скорости 5 мл/мин буфером, содержащим 50 мМ Tris pH 7,5 и 2М MgCl₂, предварительно перевернув колонку.

Полученный раствор ФСГ наносили порциями объёмом до 10 мл на колонку, наполненную сорбентом Sephadex G-25 Medium (высота слоя около 10 см), уравновешенную раствором, содержащем 1,11 г/л Na₂HPO₄*2H₂O и 0,501 г/л NaH₂PO₄*2H₂O (буфер А) на скорости 10 мл/мин. Собирали обессоленный раствор белка. Прекращали сбор на проводимости 1,9 мС/см.

Колонку HiLoad 16/60 с носителем Superdex 75 (SD75) уравновешивали буфером А на скорости 1 мл/мин и отсоединяли от системы. Абсорбирующую мембрану Sartobind S 75 помещали перед колонкой HiTrap 1 мл, наполненной носителем Capto Q. Колонку Capto Q и мембрану уравновешивали буфером А на скорости 2 мл/мин. Нанесение ФСГ-содержащего раствора осуществляли на скорости 1 мл/мин, после чего колонку и мембрану промывали 3 объёмами буфера, отсоединяли мембрану S и промывали колонку Capto Q 10 объёмами раствора, содержащего 20 мМ Tris pH 8,5 и 60 мМ NaCl. Колонку Capto Q переворачивали, и к перевернутой колонке Capto Q присоединяли сзади ранее уравновешенную колонку SD75. В колонку Capto Q, присоединённую к SD75 подавали 10 мл раствора 20 мМ Tris pH 8,5 и 250 мМ NaCl на скорости 1 мл/мин, перегружая целевой белок на колонку SD75. После этого колонку Capto Q удаляли и вели гель-фильтрацию на скорости 2 мл/мин. Собирали основной пик мономера ФСГ, отрезая передние и задние плечи пика.

3.5.4. Формулирование ФСГ-содержащего препарата

Измеряли концентрацию ФСГ по спектрофотометру, используя константу 1мг/мл=1,066 ОЕ₂₇₇. Рассчитали конечный объём (вес) раствора ФСГ для конечной концентрации 0,5 г/л. Рассчитали конечный вес раствора ФСГ для плотности 1,0246 г/л. Рассчитали навеску сахарозы для конечного содержания 68,46 г/л. Взяли на весах рассчитанную навеску сахарозы, внесли в раствор ФСГ, растворили перемешиванием. Приготовили концентрат раствора 25 мг/мл метионина, рассчитали вносимый объём для конечного содержания

метионина 0,5 г/л. Внесли рассчитанный объем в раствор ФСГ, перемешали. Приготовили концентрат раствора 20 мг/мл Tween 20, рассчитали вносимый объем для конечного содержания Tween 20 0,2 г/л. Внесли рассчитанный объем в раствор ФСГ, перемешали. Взвесили полученный раствор ФСГ, рассчитали массу вносимого буфера А до достижения конечной массы готового раствора субстанции ФСГ. Внесли под гравиметрическим контролем (на весах) рассчитанное количество буфера А (прецизионность операции - 2%). Перемешали полученный раствор субстанции, провели стерильную фильтрацию во флаконы.

Состав плацебо-раствора (на 100 мл): 0,111 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,05 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6,85 г сахарозы, 0,05 г метионина, 0,02 г Tween 20.

3.5.5. Определение примеси ДНК штамма-продуцента в очищенном препарате ФСГ

Наличие в препарате ДНК штамма-продуцента определяли методом ПЦР-РВ. Для построения калибровочной кривой использовали десятикратные разведения стандарта геномной ДНК штамма-продуцента (10 нг/мкл.). ДНК разводили плацебо-раствором, состав которого описан в разделе 2.10. Калибровочную кривую строили по точкам, лежащим в диапазоне концентраций 1 фг/мкл – 1 пг/мкл. Для проверки возможности ингибирования ПЦР к исследуемому раствору ФСГ добавляли 120 фг стандарта геномной ДНК. Реакционную смесь составляли с использованием 5X qPCRmix-HS ROX (“Евроген”, Россия), концентрация праймеров СНО49R и СНО49F составила 0,9 мкМ каждого, концентрация FAM-меченого зонда СНО49rg - 0,25 мкМ. Температура отжига праймеров - 49°C, количество циклов – 45. При помощи штатного программного обеспечения ДНК-амплификатора проводили расчет порогового цикла для всех проб и строили калибровочный график зависимости порогового цикла от концентрации геномной ДНК в пробах калибратора. Для проверки ингибирования реакции ПЦР вычисляли среднее значение концентрации геномной ДНК в пробах испытуемого образца и пробах контроля ингибирования ПЦР по калибровочному графику при помощи программного обеспечения ДНК-амплификатора. Разница в концентрации геномной ДНК в пробах должна составлять не менее 75 фг/мкл.

Содержание геномной ДНК в препарате рассчитывали по формуле:

$$X=1000 \cdot C_g / C_0, \text{ где}$$

X – содержание геномной ДНК, фг/мкг;

1000 – коэффициент пересчета объема из мкл в мл, мкл/мл;

C_g – концентрация геномной ДНК в образце, фг/мкл;

C_0 – концентрация основного вещества, мкг/мл.

Содержание геномной ДНК не должно превышать 120 фг на 1 мкг основного вещества.

3.5.6. Определение родственных примесей (окисленных форм) в препарате ФСГ

Наличие и количество окисленных форм в препарате ФСГ определяли с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Компоненты разделяли на колонке Vydac Protein C4 и определяли при 210 нм. Для изготовления окисленного стандарта к нему прибавляли 1% раствор перекиси водорода до 0,13% , перемешивали и инкубировали 20 минут при комнатной температуре. Хроматографию вели на скорости 1 мл/мин при 30°C. В качестве элюента А использовали 0,1 М триэтиламин фосфат рН 6,0, элюента В – ацетонитрил. Линейный градиент элюента В от 14% до 28% (0,25% мин).

Время, мин	Элюент А, %	Элюент В, %
0	86	14
56	72	28
57	0	0
72	0	0
73	86	14

Время удерживания пика альфа-субъединицы должно отличаться от аналогичного пика раствора стандарта не более чем на 3% (критерий подлинности). Пики, соответствующие окисленной форме альфа-субъединицы должны элюироваться в течение 10 минут перед основным пиком неокисленной альфа-субъединицы. Отношение площади пиков, соответствующих продуктам окисления альфа-субъединицы к площади пика неокисленной альфа-субъединицы не должно превышать 15%.

3.5.7. Трипсинолиз ФСГ

К 100 мкл ФСГ добавили ДТТ до 20 мМ, инкубировали 40 мин при 45°C. Далее к раствору добавили йодацетамид до 50 мМ, инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Остатки ДТТ и йодацетамида убирали путём диафильтрации на ячейке 3 кДа против 20 мМ Tris рН 7,5. Добавляли трипсин до 10 мкг/мл, инкубировали ночь при 37°C.

3.5.8. Анализ сахаров

К 300 мкл анализируемого раствора (содержание сахаров 10-30 мкг/мл) добавляли 2,5 мкл раствора 80% фенола в воде. Запускали реакцию добавлением 700 мкл концентрированной серной кислоты, тщательно перемешивали. Инкубировали 10 минут при комнатной температуре, потом 10-20 минут при 27°C в термостате. Оптическую плотность измеряли при длине волны 490 нм.

3.5.9. Резорциноловый метод определения сиаловой кислоты

Определение содержания сиаловой кислоты производили с помощью резорцинового реагента. Резорциновый реагент изготавливали следующим образом: 60 мкг резорцинола растворяли в 4 мл воды, добавляли 6 мл концентрированной HCl и 15,6 мкл 160 мМ раствора CuSO₄.

Образец для исследований готовили аналогично указанному в пункте 2.1. К 50 мкл растворов, содержащих 300, 150, 75, 37,5 и 18, 75 мкл полисиаловой кислоты или исследуемого раствора добавляли 10 мкл 40 мМ HIO₄ и инкубировали 35 минут на льду. Добавляли 125 мкл резорцинолового реагента и инкубировали на льду 5 мин. Далее пробы помещали в термостат при 95°C на 15 мин. Пробы охлаждали, добавляли 125 мкл этилового спирта, перемешивали и выдерживали 3 минуты при 37°C. Далее пробы оставляли на 5 минут при комнатной температуре и проводили измерения на спектрофотометре при длине волны 600 нм. По результатам измерений строили калибровочный график и с его помощью вычисляли концентрацию сиаловой кислоты в исследуемом препарате.

3.5.10. Масс-спектрометрия

Триптический гидролиз белка в полиакриламидном геле, окрашенном Coomassie Brilliant Blue (G-250): кусочек геля размером 3-4 мм³ дважды промывали (для удаления красителя) в 100 мкл 40% раствора ацетонитрила в 0.1 М NH₄HCO₃ в течение 20 мин при 37°C. После удаления раствора (для дегидратации геля) добавляли по 100 мкл ацетонитрила. Удалив ацетонитрил и высушив кусочек геля, прибавляли к нему 4 мкл раствора модифицированного трипсина (Promega) в 0.05M NH₄HCO₃ с концентрацией 15 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 5 ч при 37°C, затем к раствору добавляли 7 мкл 0.5 % ТФУ в 10 % растворе водного ацетонитрила и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор использовали для получения MALDI-масс-спектров.

Подготовка образцов для масс-спектрометрии проводилась следующим образом: на мишени смешивали по 2 мкл раствора образца и 0.5 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (Aldrich, 20 мг/мл в 20 % водном ацетонитриле, 0.5% ТФУ), полученную смесь высушивали на воздухе.

Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре UltrafleXtreme BrukerDaltonics (Германия), оснащенный УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.003 % (30ppm). Спектры получали в диапазоне масс 700-4500 m/z, выбирая мощность лазера оптимальную для достижения наилучшего разрешения. Картирование пептидов вели при помощи программы GPMaw (Lighthouse data, Дания).

3.6. Получение мкАт

3.6.1. Получение мкАт к фVII

В качестве антигена для **иммунизации животных** использовали коммерческий препарат НовоСевен, активная субстанция эптакoг-альфа (активированный рекомбинантный коагуляционный фактор VIIa), содержание субстанции в ампуле 60 КЕД (1,2 мг).

Иммунизацию проводили по следующей схеме, приведенной в (Таб. 9).

Таблица 9. Схема иммунизации мышей рекомбинантным фVIIa и определение титров специфических антител.

№ иммунизации	Интервал после 1-ой иммунизации, дней	Способ введения антигена	Объем инокулята, мл	Количество вводимого белка, мкг(ЕД)	Состав вводимого препарата	Медиана титра АТ
1	0	п/к	0,5	10(500)	АГ+ПАФ	1:80*
2	14	п/к	0,5	10(500)	То же	1:160*
3	28	п/к	0,5	10(500)	-	1:1280*
4	56	в/б	0,5	25(1250)	АГ	1:10240**

Примечания: 1. * -определение титра антител спустя 14 суток после иммунизации, ** - определение титра АТ через 3-е суток после заключительной иммунизации. 2. АГ - антиген, п/к - подкожно, в/б – внутривенно.

Было иммунизировано 5 мышей линии Balb/c. Стабильно высокий титр показали 4 мыши, который и были использованы для выделения спленоцитов.

Для **получения гибридом**, продуцирующих МКАт к коагуляционному фактору VIIa использовали следующую методику: в 96-луночные культуральные планшеты разливают суспензию фидерных клеток (перитонеальные макрофаги белых мышей). В каждую лунку вносят 50 мкл суспензии, содержащей $\approx 1 \cdot 10^5$ клеток. Планшет помещают в термостат (в атмосферу 5% CO₂) на 24 ч. Иммунизированных рекомбинантным коагуляционным фактором VIIa самок мышей BALB/c обескровливают, вскрывают брюшную полость с соблюдением правил асептики и удаляют селезенку, которую помещают в стерильную чашку Петри. Спленциты выделяют методом перфузии, вводя в селезенку шприцем бессывороточную среду DMEM (Панэко, Москва). Процедуру продолжают до тех пор, пока селезенка при визуальной оценке не потеряет 20-30 % от исходного объема.

Полученную суспензию переносят в стерильную пластиковую центрифужную пробирку. Спленциты осаждают при 1000 об·мин⁻¹ в течение 10 мин. Осадок спленцитов ресуспендируют в 20 мл бессывороточной среды и проводят переосаждение в том же режиме. Эту процедуру повторяют еще 2 раза. Осадок спленцитов ресуспендируют в 2,5 мл среды, определяют общее количество выделенных спленцитов и помещают на ледяную баню. Из одной селезенки мыши получают от 150 до 250 млн спленцитов. Из культуральных матрасов с клетками миеломы NS2/0, находящимися в экспоненциальной фазе роста, сливают содержащую клетки культуральную жидкость. Клетки миеломы осаждают центрифугированием при 1000 мин⁻¹ в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в 20 мл бессывороточной среды и проводят переосаждение в том же режиме. Эту процедуру повторяют еще 1 раз. Осадок клеток миеломы ресуспендируют пипетированием в 2,5 мл среды и подсчитывают общее количество клеток. Клетки миеломы и спленциты объединяют, исходя из расчетного соотношения 1:5. К полученной смеси добавляют 20 мл среды полной среды DMEM и перемешивают суспензию пипетированием. Клетки осаждают центрифугированием в течении 10 мин при 2000 мин⁻¹. Надосадочную жидкость полностью удаляют из центрифужного стакана.

К осадку по каплям при перемешивании в течение 15-20 секунд добавляют 1,0 мл раствора, содержащего 40% ПЭГ 3500 и 10% диметилсульфоксида. Затем полученную суспензию перемешивают в течение 1 мин и добавляют по каплям со скоростью 1 мл в минуту 5 мл среды, перемешивая жидкость круговыми движениями пипетки. Общий объем суспензии быстро доводят до 40 мл бессывороточной средой DMEM. Клетки осаждают центрифугированием в течение 10 мин при 2000 мин⁻¹. Надосадочную жидкость полностью удаляют из центрифужного стакана.

Клетки ресуспендируют в культуральной среде DMEM, содержащей 20% фетальной

телячьей сыворотки (ФТС) и 2% концентрата НАТ, до конечной концентрации спленоцитов 1 млн клеток/мл. Приготовленную суспензию вносят в лунки культурального 96-луночного планшета с фидерными клетками по 100 мкл на лунку. Планшет помещают в термостат в атмосферу 5% CO₂.

Начиная с 7-х суток после слияния и далее ежедневно до окончания роста клеток лунки просматривают с помощью инвертированного микроскопа. Регистрируют наличие колоний в лунках и число колоний в каждой лунке. Одновременно в тех же условиях проводят изучение роста клеток миеломы, взятых для слияния. Дальнейшую селекцию проводят только тогда, когда в данном варианте опыта регистрируют отсутствие роста клеток миелом. При зарастании растущими гибридными клетками 30-50% поверхности лунки проводят скрининг полученных линий гибридных клеток на секрецию специфических антител с помощью ИФА.

Из лунок с растущими клетками гибридом отбирают по 100 мкл культуральной жидкости и полученные аликвоты разводят в соотношении 1:1 ФСБ, рН 7,3. Пробы анализируют на наличие специфических антител к VIIa с помощью ИФА. На первом этапе выявляют лунки с растущими антител-продуцирующими гибридами (гибридными линиями). Для изучения отбирают все линии, в которых значение оптической плотности при длине волны 492 нм в 2,1 и более раза превосходит соответствующий показатель в отрицательном контроле. Затем в отобранных "положительных" линиях гибридом определяют общий титр продуцируемых МКАт. Линии, для которых значение данного показателя не менее чем 1:16, подвергают клонированию.

Клонирование линий гибридом проводят следующим образом: собирают клетки из лунки, проводят их подсчет и рассеивают в 96-луночный планшет с фидерными клетками на среде ДМЕМ с 20% ФТС из расчета 1 клетка на лунку. Культивирование проводят при 37 С в атмосфере 5% CO₂. Далее в лунках определяют наличие растущих колоний и по мере их разрастания проводят скрининг на наличие специфических антител с помощью ИФА. Отбор клонов для дальнейшего повторного клонирования проводят по следующим критериям: лунки с одной растущей колонии; наивысший титр специфических МКАт (при относительно одинаковой плотности клеток в лунке).

Приготовление фидерных клеток: белых мышей умерщвляют путем цервикальной дислокации и помещают на 10 мин в 96% этиловый спирт. Затем мышь фиксируют с помощью игл на лотке, залитом парафином. Соблюдая правила асептики, пинцетом и ножницами отделяют кожу от брюшины. В брюшине ножницами прорезают отверстие

диаметром 1-2 мм и в него пипеткой вводят 3-5 см³ среды для культивирования гибридом с добавлением 2% (V:V) среды ПАТ. Через 30 секунд жидкость пипеткой переносят в центрифужную пробирку, доводят общий объем до 10 см³ и разливают по 0,05 см³ в лунки 96-луночного планшета и по 0,5 см³ в лунки 24-луночного планшета. Планшет помещают на 1 сутки в термостат с регулируемой подачей CO₂ при температуре (37±0,5)°C.

Для **получения кондиционированной культуральной среды**, содержащей МКАт, ампулу с замороженной суспензией клеток гибридомы, извлеченную из жидкого азота, вскрывают и дробно (с интервалом 3 мин) вносят в нее 10 см³ предварительно подогретой до температуры (37±0,5)°C бессывороточной среды ДМЕМ. Содержимое ампулы переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 10 минут при 1500 мин⁻¹. После окончания центрифугирования надосадочную жидкость сливают, доводят объем осадка до 5,0 см³ средой, содержащей 20 % ФТС, определяют концентрацию и долю жизнеспособных клеток. Клетки гибридомы засевают на 24-луночный планшет с фидерным слоем из расчета объема заполнения лунок 1 см³ и концентрации клеток 2*10⁵-3*10⁵ клеток*см³. Планшеты с засеянными клетками переносят в термостат с регулируемой подачей CO₂ и осуществляют культивирование при температуре (37±0,5)°C, влажности 80 % и содержании CO₂ 5 %. Рост клеток ежедневно контролируют с помощью микроскопирования. При заполнении клетками всего поля зрения (95-100% поверхности лунки), обычно через 3-4 суток, клетки гибридомы, взятые в экспоненциальной фазе роста, используют для посева в матрасы CellLine 350. Состав ростовой среды для культивирования гибридом на полупроницаемых мембранах в матрасах CellLine 350 представлен в (Таб. 10).

Таблица 10. Состав ростовой среды для культивирования гибридом на полупроницаемых мембранах.

Компонент ростовой среды	Содержание компонента, % (v/v)
Среда ДМЕМ	82,9
ФТС	10-20
Инсулин, удельная активность 1 00 Ед. см"	0,2
Глюкоза (30% раствор)	1,2* (0,8**)
Глутамин(3% раствор)	1,0* (1,5**)
Гентамицин сульфат	0,1

Примечание:

* - при проведении 1-го пассажа, ** - при проведении 2-го и последующих пассажей

Клетки гибридом концентрируют центрифугированием в течение 10-15 мин при 1500 об-мин⁻¹. В большой отсек (питательный модуль) вносят 50-75 см³ питательной среды без

ФТС для смачивания мембраны. Посевную культуру в расчетной концентрации 1,5-10 клеток*см⁻³ вносят в малый отсек. Объем питательной среды без ФТС в большом отсеке доводят до 250...350 см³. Матрасы с засеянными клетками помещают в термостат с регулируемой подачей CO₂ и культивируют при температуре (37±0,5)°С и содержании CO₂ 5 %. Ежедневно контролируют величину рН питательной среды, концентрацию клеток и долю жизнеспособных клеток.

Сбор биомассы клеток и наработанных МКАт проводят начиная с 7 суток культивирования. Для этого из большого отсека при помощи пипетки отбирают среду, содержащую МКАт. Из малого отсека отбирают 2,5 см³ клеточной суспензии и добавляют равный объем свежей полной среды с 10...20% ФТС. Подсчитывают концентрацию и долю жизнеспособных клеток в отобранной суспензии. Затем в большой отсек (питательный модуль) вносят 50...75 см питательной среды без ФТС для смачивания мембраны. Объем питательной среды без ФТС в большом отсеке доводят до 250...350 см³. Данную операцию повторяют через каждые 5 суток. Таким образом, частота пересева при проведении 1 -го пассажа - 7 суток, при проведении 2-го и последующего пассажей - 5 суток. Во время каждого отбора культуральной жидкости, содержащей биомассу клеток гибридом и МКАт, отбирают пробу для определения концентрации и доли жизнеспособных клеток.

Среду из большого модуля используют в дальнейшем для выделения из нее МКАт. Суспензию клеток из малого модуля используют, как посевную культуру после смены среды на свежую и (после осаждения клеток) для выделения МКАт. В культуральных жидкостях проводят определение титра специфических МКАт. Культуральные жидкости, содержащие специфические антитела в титре 1:320 и выше (при определении в ИФА), объединяют и используют для получения очищенных препаратов МКАт.

Наработку биомассы гибридом *in vivo* проводят по следующей схеме: разморозка 2 ампул с культурой клеток гибридом (V=1 мл, концентрация клеток 1 млн кл.см⁻³.) Продолжительность 1 час, 50 мл среды DMEM (RPMI 1640) с 20 % ФТС.

Накопление гибридом для оценки их культуральных и секреторных свойств. После разморозки клеточную суспензию вносят в лунки 24-луночного планшета. Посевная концентрация 200 000 клеток на мл. Продолжительность 20 суток, 5 пассажей. Контроль при каждом пассаже. Оценивают равновесную концентрацию клеток, относительную скорость роста, жизнеспособность клеток, отсутствие посторонней микро-флоры, титр секретируемых антител. 300 мл среды DMEM (RPMI 1640) с 10 % FBS.

Культуру клеток переносят в пластиковый матрас с площадью рабочей поверхности 75 см². Посевная концентрация 300 000 кл.см⁻³. Продолжительность 12 суток, 3 пассажа.

Оценивают равновесную концентрацию клеток, относительную скорость роста, жизнеспособность клеток, отсутствие посторонней микро-флоры, титр секретируемых антител. 1000 мл среды DMEM (RPMI 1640) с 10 % FBS.

Мышам вводят подкожно 0,5 мл минерального масла «Пристан». 50 мышей линии BALB/c самки с массой 15-18 г. Продолжительность 7 суток. Культивирование гибридом *in vivo*. Культуру клеток вводят мышам линии BALB/c в дозе 10 млн клеток на мышь внутрибрюшинно. Культивирование *in vivo* ведут до образования асцитических опухолей объемом не менее 4-5 мл. Продолжительность культивирования от 10 до 21 суток.

Забор асцитических жидкостей. Животных с развившимися асцитами после цервикальной дислокации вскрывают с соблюдением правил асептики, забирают асцитическую жидкость из брюшной полости.

Приготовление концентрированных препаратов мКАт: к содержащей мКАт культуральной или асцитной жидкости добавляют равный объем 45% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, раствор перемешивают и выдерживают 2 ч при температуре 4°C. Иммуноглобулины осаждают центрифугированием при 3000 об-мин⁻¹ в течение 20 мин. Осадок растворяют в БФР (для культуральной жидкости объем БФР составляет 1/8 от исходного объема антителосодержащего субстрата, для асцитной жидкости добавляют равный исходному объем БФР) и диализуют против БФР в течение 18-20 ч при температуре 4 °C.

3.6.2. Получение мКАт к фVIII

Иммунизацию, слияние и клонирование гибридом проводили согласно [269]. Самок мышей линии Balb/c (Harlan Labs, Великобритания) иммунизировали подкожно 100 нг рекомбинантного полноразмерного фVIII (Когенейт ФС производства Bayer HealthCare LLC, США) в 0.25 мл 0.85% NaCl и 0.25 мл полного адьюванта Фрейнда (Pierce Biotechnology, США). Через 2 и 4 недели после первой инъекции повторно вводили 100 нг антигена в неполном адьюванте Фрейнда. Через 1 неделю после последней инъекции отбирали пробы крови из хвостовых вен мышей, и измеряли уровень специфических антител в сыворотке методом ИФА. Одну мышь с максимальным титром IgG использовали для слияния спленоцитов с клетками миеломы SP2/0 при помощи полиэтиленгликоля (ПЭГ). Клетки после слияния выращивали в селективной среде, рассеивали в лунки 96-луночных планшетов и определяли титр IgG к фVIII. Клетки из лунок с положительным сигналом переносили в лунки 24-луночных планшетов и определяли титр специфических IgG и чувствительность к элюции раствором 50% этиленгликоля в PBS. Клетки из лунок с наивысшими титрами и максимальной чувствительностью к элюции этиленгликолем использовали для клонирования

гибридом методом предельного разведения (0.5 клеток/лунка). Гибридомные клоны выращивали, повторно проводили скрининг по указанной выше схеме и клонировали. Выращенные гибридомы использовали для получения кондиционированной культуральной среды (10–100 мл) и получения асцитной жидкости в мышах линии Balb/c, предварительно сенсibilизированных введением Пристана (Sigma). Собранную асцитную жидкость замораживали до дальнейшего использования.

мкАт из асцитной жидкости и кондиционированной среды очищали по одинаковому протоколу – преципитация сульфатом аммония, аффинная хроматография на колонке HiTrap Protein G HP (GE Healthcare) объемом 1 мл, концентрирование элюированных IgG ультрафильтрацией и окончательная очистка, совмещенная с обессоливанием, при помощи гель-фильтрации на колонке Superdex 75 10/300 (GE Healthcare) в растворе PBS. Иммуносорбенты получали при помощи смолы NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow (GE HealthCare) по инструкции производителя. Связывание антигена проводили методом адсорбции в объеме, для этого аликвоты кондиционированной среды объемом 1 мл в микроцентрифужных пробирках смешивали с аликвотами (0.1 мл) суспензии иммуносорбентов в PBS и инкубировали при перемешивании в течение 1 ч при комнатной температуре. Иммуносорбенты осаждали центрифугированием в течение 15 с, супернатанты обедненной культуральной среды собирали для дальнейшего анализа. Сорбенты промывали тремя порциями по 1 мл PBS, связавшиеся белки элюировали, добавляя 0.15 мл 50% раствора этиленгликоля в PBS и инкубируя в течение 5 мин.

3.7. Компьютерное моделирование

Расчеты проводились при помощи трех четырёхъядерных рабочих станций с архитектурой Intel x86, работающих под управлением ОС Linux (сборка Fedora Core 12 x86 32 bit). В процессе подготовки файлов библиотек химических соединений и трёхмерной структуры белка к докингу использовались внутренние утилиты оболочки для докинга Maestro (Schrödinger, США). Для фильтрации виртуальных библиотек химических соединений и конвертации записей в формат SMILES использовалась утилита OpenBabel [237]. Модификация записей молекул в формате SMILES производилась при помощи текстового редактора Notepad++. Модифицированные записи, содержащие данные о линкерных группах, были подготовлены к докингу при помощи утилиты LigPrep (Schrödinger).

В работе была использована пространственная структура фактора VIII PDB код 2R7E [238], которая была модифицирована следующим образом: домены, не несущие (по

литературным данным [239]) на своей поверхности сайтов связывания референсных лигандов, были удалены ручным редактированием координатного файла. Далее координатный файл был подготовлен к докингу при помощи утилиты ProteinPrep из пакета Maestro.

Для фильтрации результатов докинга и отождествления отобранных соединений с фактически синтезированными была использована онлайн-система поиска и заказа у поставщиков по двумерным химическим формулам eMolecules.

3.8. Методы анализа ФСГ в фармацевтических композициях.

Эксклюзионная ВЭЖХ. Определение концентрации ФСГ проводили с использованием хроматографа Waters 2790 (США) с УФ-детектором, колонки Superdex 75 10/300 GL (300 x 10 мм) (GE LifeSciences, США). Рассчитывали объемы пиков гетеродимера ФСГ (основной пик) исследуемого образца и стандартного образца Европейской фармакопеи фоллитропина CRS (кат. ном. Y0001629, EDQM).

Определение сахарозы. Определение концентрации сахарозы проводили с использованием метода ВЭЖХ, колонки YMC Poliamine II (4,6x250 мм, 5 мкм) (YMC, Япония) и стандартного раствора сахарозы.

Определение полисорбата 20. Концентрацию полисорбата 20 определяли спектрофотометрическим методом с тиоцианат-кобальтовым реагентом (30 г/л $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и 200 г/л NH_4SCN , смешивается с нейтрализованной пробой в соотношении 3:1) после гидролиза образцов 10 М NaOH (30 мин на кипящей водяной бане) и нейтрализации 10 М раствором уксусной кислоты. Полученные окрашенные растворы экстрагировали половиной объема метилхлорида и измеряли оптические плотности органических фаз при длине волны 320 нм. Строили калибровочную кривую линейной зависимости измеренной оптической плотности от концентрации полисорбата 20 (диапазон концентраций 0,1 — 0,4 г/л) с вычислением среднего арифметического концентрации полисорбата 20 в испытуемом растворе по полученной калибровочной кривой.

Определение бензилового спирта. Определение концентрации бензилового спирта проводили с использованием метода ОФ-ВЭЖХ, колонки YMC-Pack ODS-A 100x4,6, 5 мкм, 300 Å (YMC, Япония).

Определение L-метионина. Определение концентрации метионина проводили с использованием метода ОФ-ВЭЖХ, колонки Vydac C18 (4,6x250 мм, 5 мкм) (Grace, США).

Определение биологической активности in vivo. Определение биологической активности ФСГ проводили в соответствии с Европейской фармакопеей изд. 8.5 (главы 2285 и 2286).

Статистическая обработка данных проводится в соответствии с принципами расчета биологической активности, изложенными в ЕФ (глава 5.3), где масса яичников рассматривается в качестве величины ответной реакции. В качестве стандартного образца использовался 2-ой международный стандарт Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) для рекомбинантного ФСГ (Код 08/282, 126 МЕ (10 мкг в ампуле)).

Определение рН. Для определения рН приготовленных растворов, использовали рН-метр, откалиброванный по стандартным буферным растворам, приготовленным на воде, свободной от углекислого газа, при той же температуре, при которой проводят измерение рН испытуемого раствора. Чувствительность определения не менее 0,05 ед. рН.

3.9. Методы физико-химического анализа субстанции ФСГ

2.9.1 Определение первичной последовательности.

Подготовка образцов. Для восстановления дисульфидных связей к 100 мкл раствора ФСГ, добавляли дитиотрейтол (Fermentas, Литва) до 20 мМ, инкубировали 40 мин при 45°C. Далее к раствору добавляли йодацетамид (Sigma, США) до 50 мМ, инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Остатки ДТТ и йодацетамида убирали путём диафильтрации на ячейке Vivaspin 500 (Sartorius, США) с отсекающей способностью 3 кДа против 20 мМ Tris рН 7,5. Отбирали аликвоту из обессоленного раствора испытуемого образца ФСГ в отдельную пробирку (холостая проба). Добавляли трипсин (Sigma, США) до 10 мкг/мл, инкубировали ночь при 37°C.

Обращеннофазовая хроматография. Подвижная фаза А: 5% ацетонитрил (Baker, США), 0,1% трифторуксусная кислота (Sigma, США) в воде. Подвижная фаза В: 70% ацетонитрила, 0,1% трифторуксусная кислота в воде.

Таблица 11. Условия проведения хроматографии:

Прибор:	Жидкостный аналитический хроматограф с дегазатором, термостатом колонок и УФ-детектором с переменной длиной волны.	
Колонка:	Vydac Protein C18 (Grace, США), 250x4,6 мм	
Программа градиента	Время, мин	B%
	0	0
	2	0
	62	60
	63	100
	64	100
	65	0
Скорость потока	1,0 мл/мин	
Длина волны детектора	210 нм	
Объем вносимой пробы	25 мкл	
Температура колонки	40 °С	
Порядок ввода проб и число повторностей	Холостой раствор	1
	Раствор стандартного образца	≥2
	Испытуемый раствор	≥2

Для хроматографического разделения использовали 13 мкг раствора ФСГ, введенные в колонку в объеме 26 мкл. Рассчитывали времена удержания не менее чем 10 пиков пептидных фрагментов альфа- и бета-цепей ФСГ для испытуемой пробы и пробы стандартного образца при помощи программного обеспечения хроматографа. Для каждого пика пептидного фрагмента цепей ФСГ, выявляемого на всех четырех хроматограммах, вычисляли относительное время удержания как отношение времен удержания данного пика для проб испытуемого образца и стандартного образца. Подлинность считалась установленной, если на хроматограммах испытуемого образца было обнаружено не менее 10 пиков, для каждого из которых относительное время удержания составляет от 0,97 до 1,03. Фракции, соответствующие видимым пикам, собирали, высушивали под вакуумом и использовали для масс-спектрометрического анализа методом MALDI-TOF.

Идентификация пептидов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Подготовка образцов для масс-спектрометрии проводилась следующим образом: к раствору белка добавляли 5 мкл 10 мМ дитиотрейтола в 0,1 М NH_4HCO_3 и инкубировали 30 мин при 50°C, далее образец делили на две части (по 5 мкл): к одной добавляли 4-винилпиридин (Sigma, США) до 20 мМ и снова инкубировали в течение 30 мин при 50°C. Оба образца подвергали хроматографии на колонке ZipTip C18 P10 (Millipore, США), элюцию осуществляли 5 мкл 75 % ацетонитрила с 0,5% трифторуксусной кислоты. На мишени смешивали по 3 мкл раствора образца и 0,5 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты

(Aldrich, США), 10 мг/мл в 20 % ацетонитриле в воде с 0,5 % трифторуксусной кислоты), полученную смесь высушивали на воздухе.

Масс-спектры были получены на тандемном времяпролетном масс-спектрометре Bruker Ultraflex III (Bruker, США), оснащенный УФ-лазером (337 нм), в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Точность измеренных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.015 %.

Белки идентифицировали с помощью программы GpMaw версия 9.0 (Lighthouse Data, Австралия) с поиском в NCBI-нр базе данных, используя следующие параметры анализа: (1) пептиды являются моноизотопами; (2) допуская возможность окисления остатков метионина кислородом воздуха и модификации остатков цистеина; (3) с одним допустимым сайтом в пептиде, не подвергшимся гидролизу трипсином.

3.9.2. Изучение вторичной и третичной структуры

Круговой дихроизм. Исследование структуры образцов проводилось с использованием спектроскопии кругового дихроизма (КД) на спектрополяриметре Chirascan CD Spectrometer (Applied Photophysic, Великобритания). Значения молярной эллиптичности рассчитывались из уравнения: $[\theta] = [\theta]_{\text{изм}} \text{Мост}/(LC)$, в котором C – концентрация белка (мг/мл), L – длина оптического пути кюветы (мм), $[\theta]_{\text{изм}}$ – измеренная эллиптичность (градусы) и Мост – обычно, средняя молекулярная масса остатка пептида (Да). В этой работе использовался $\text{Мост} = 100$ Да, ввиду сравнительной оценки образцов. Измерения спектров дальнего КД (195-250 нм) проводились в 0.1 мм кювете, спектров ближнего КД (260-320 нм) - в 1 мм кювете.

Метод флуоресценции. Спектры флуоресценции и плавление белка проводили используя флюориметр Varian Core 100 (Agilent Technologies, Австралия), в кюветах с длиной оптического пути 10 мм. Плавление обоих образцов проводилось одновременно в одном кюветодержателе. Относительная ошибка отличия температуры между образцами $\pm 0.1^\circ\text{C}$. Абсолютная погрешность определения температуры образцов $\pm 3^\circ\text{C}$.

3.9.3. Определение состава N-гликанов

N-гликаны были отделены от ФСГ и помечены флуоресцентным красителем Instant-2AB (2-аминобензамид, Sigma, США) с использованием набора GlykoPrep Rapid N-Glycan Preparation (Prozyme, США). Определение типа N-гликанов проводили с использованием гидрофильной (нормальнофазовой) ВЭЖХ (HILIC). Подвижная фаза А: 250 мМ аммония формиат (Sigma, США) pH 4,4; В: 100% ацетонитрил.

Таблица 12. Условия разделения гликанов методом нормальнофазовой ВЭЖХ

Прибор:	ВЭЖХ хроматограф Shimadzu с флуоресцентным детектором	
Колонка:	GlykoSep N-Plus (Prozyme, США), 4,6x150 мм	
Программа градиента	Время, мин	В%
	0	80
	2	70
	112	41,53
	112,1	20
	118	20
	118,1	80
	130	80
Скорость потока	0,4 мл/мин	
Длина волны детектора	$\lambda_{\text{возб}} = 278 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{эм}} = 344 \text{ нм}$	
Объем вносимой пробы	5 мкл	
Температура колонки	50 °С	

В качестве внешних стандартов для библиотеки Instant2AB-меченых N-гликанов использовали IgG человека (Prozyme, США) и РНКазу В быка (Prozyme, США).

Определение состава сиаловых кислот.

Подготовка сиаловых кислот с использованием набора для маркировки Glyco Signal DMV Labeling (Prozyme, США). Определение типа сиаловых кислот проводили с помощью метода ОФ-ВЭЖХ.

Таблица 13. Условия разделения сиаловых кислот методом ОФ-ВЭЖХ.

Прибор:	ВЭЖХ хроматограф Shimadzu с флуоресцентным детектором	
Колонка:	GlykoSep R™ (Prozyme, США), 4,6x150 мм	
Градиент:	Изократический	
Элюент:	Ацетонитрил : Метанол : Ультрарачистая вода (9:7:84)	
Скорость потока	0,5 мл/мин	
Длина волны детектора	$\lambda_{\text{возб}} = 373 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{эм}} = 448 \text{ нм}$	
Объем вносимой пробы	10 мкл	
Температура колонки	25 С	

3.9.4. Определение биологической активности *in vitro*

Биологическая активность ФСГ *in vitro* была проанализирована с использованием культивируемых гранулезных клеток человека. В настоящем анализе, серийные разбавления ФСГ были проинкубированы с клетками в течение 48 часов. После окончания инкубации, клеточная среда была проанализирована на наличие секретированного прогестерона с использованием коммерческого набора для иммуноферментного анализа ФСГ (DRG Diagnostics, Германия). Специфические активности были определены на основе сравнения значений EC50, полученных с использованием ограниченных четырехпараметрических логистических дозозависимых кривых, с использованием программного обеспечения PLA

2.1 (Stegmann Systems, Германия). Подготавливались 10 серий разбавлений с шагом 1:3, с четырехкратным анализом каждой концентрации разбавления.

3.10. Методы исследования ФСГ *in vivo*

3.10.1. Определение биологической активности *in vivo*

Определение биологической активности ФСГ проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными в Европейской фармакопее изд. 8.5 (главы 2285 и 2286). Все манипуляции и процедуры с животными здесь и далее проводились в соответствии с существующими руководствами и были рассмотрены и утверждены комиссией по уходу и использованию животных на предмет соответствия этическим принципам обращения с животными.

Для исследования использовали неполовозрелых самок крыс одной и той же линии (Wistar, Питомник лабораторных животных «Пушино», Филиал ИБХ РАН) возрастом в диапазоне 19÷28 дней, различающихся по возрасту не более чем на 3 дня и с различиями по массе не превышающими 10 г. Статистическая обработка данных проводилась в соответствии с изложенными в ЕФ изд. 8.5 (глава 5.3) принципами расчета биологической активности с использованием метода сравнения линий дозозависимости исследуемого препарата и препарата с известной биологической активностью, по определению соотношения углов наклона регрессий, где масса яичников рассматривается в качестве величины ответной реакции стимуляции ФСГ.

3.10.2. Острая токсичность.

Определение острой токсичности проводили на аутбредных белых мышах самках (Питомник: Филиал «Андреевка» ФГБУ «НЦБМТ» РАМН), массой 20-24 г (1 группа по 6 особей для исследуемого препарата Примапур[®], 1 группа по 6 особей для препарата сравнения Гонал-Ф[®] и одна контрольная группа). Препараты вводили мышам однократно подкожно в дозе 5000 МЕ/кг в объеме 0,5 мл/25 г массы тела. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Путь введения соответствует таковому при клиническом применении препаратов. Наблюдение за животными проводили в течение 14 дней. Клинический осмотр мышей для выявления отклонений в состоянии здоровья при изучении острой токсичности проводили в течение первого часа после введения препаратов и далее ежедневно (утром и вечером) в течение 14 суток после введения препарата. Оценивали спонтанное поведение животных в клетке: регистрировали наличие признаков угнетения или возбуждения центральной нервной системы, судороги, тремор.

Наблюдение за животными проводили в течение 14 дней. Регистрацию массы тела животных проводили непосредственно перед введением тестируемых препаратов, далее – ежедневно в течение 14 дней.

3.10.3. Подострая токсичность.

Сравнительное изучение подстрой токсичности препарата Примапур[®] и референтного препарата Гонал-Ф[®] было проведено на крысах самках (Питомник: Филиал «Андреевка» ФГБУ «НЦБМТ» РАМН), массой 200-220 г. (3 группы по 8 особей), с применением 10-кратной максимальной суточной терапевтической для человека дозе (450 МЕ/сутки), которая с учетом метаболических коэффициентов для самок крыс [26], составила 450 МЕ/кг/сутки. Группы животных: контрольная группа 1 – подкожное введение 0,9 % раствора натрия хлорида; подопытная группа 2 – подкожное введение препарата Примапур[®] в дозе 450 МЕ/кг; подопытная группа 3 – подкожное введение препарата Гонал-Ф[®] в дозе 450 МЕ/кг. Препараты вводили подкожно в первой половине дня в течение 28 дней. Продолжительность подострого эксперимента 4 недели была установлена в соответствии с требованиями по разработке биоаналогичных лекарственных препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции ФСГ [17, 19]. Проводилась оценка общего состояния, включающая клинический осмотр, измерение массы тела, потребление корма и воды. Физиологические исследования включали в себя изучение: (1) сердечно-сосудистой системы, с использованием электрокардиографа «Поли-Спектр-8/В» (Нейрософт, Россия); (2) нервной системы по методике, описанной ранее [27]; (3) ректальной температуры; (4) мочевыделительной системы (спонтанный диурез за 18 часов, удельная масса мочи, рН мочи, содержание билирубина, кетоновых тел, глюкозы, белка, эритроцитов, лейкоцитов), с использованием анализатора «DocUReader» (77 Elektronika Kft., Венгрия); (5) общий анализ крови (количество эритроцитов, уровень гемоглобина, гематокрит, количество лейкоцитов, лейкоцитарная формула, среднее содержание гемоглобина в/на клетку, средний объем эритроцита, количество тромбоцитов и ретикулоцитов), с использованием автоматического гематологического анализатора «BC-2800 Vet» (Mindray, Китай); (6) биохимический анализ сыворотки крови с определением аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, глюкозы, общего белка, холестерина, триглицеридов, креатинина, мочевины проводили с помощью диагностических наборов «Ольвекс диагностикум» (Россия), регистрацию оптической плотности проводили на цифровом фотометре AP-700 (ApeI, Япония), уровень глюкозы

определяли в цельной крови с помощью глюкометра «OneNouch Select» (Johnson & Johnson, США).

По окончании введения животные были подвергнуты полной некропсии, которая включала осмотр внешней поверхности тела, места инъекции, всех проходов, черепной, грудной, брюшной полостей и их содержимого. Нижеследующие органы были взвешены у всех животных при некропсии: надпочечники, головной мозг, яичники, сердце, печень, селезенка, почки, щитовидная железа. Гистологическое исследование надпочечников, сердца, головного мозга, селезенки, почек, печени, легких, желудка, тонкого и толстого кишечника, поджелудочной железы, яичников, места введения препаратов было проведено по методике, описанной ранее [28].

Местно-раздражающее действие оценивали при макроскопическом и микроскопическом исследовании участка кожи верхней половины холки крыс.

3.11. Методы проведения клинического исследования ФСГ

Исследования с участием добровольцев были проведены на базе ГБУЗ города Москвы «Городская клиническая больница № 15 им. О. М. Филатова Департамента Здравоохранения города Москвы». На проведение клинического исследования спонсором ООО «АйВиФарма» было получено разрешение № 547 от 30 сентября 2015 г., выданное Министерством здравоохранения.

Протокол исследования был одобрен Независимым этическим комитетом ГКБ № 15 им. О. М. Филатова. Исследование проводилось в соответствии с протоколом, принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (Форталеза, Бразилия, 2013 г.), трехсторонним соглашением по надлежащей клинической практике (ICHGCP), а также действующим законодательством РФ.

Использовали препараты фоллитропина альфа: исследуемый в целях государственной регистрации в РФ биоаналоговый препарат Примапур, раствор для подкожного введения и оригинальный препарат сравнения Гонал-ф («Мерк-Сероно С.п.А.», Италия), раствор для подкожного введения.

Дизайн исследования — проспективное, рандомизированное, перекрестное, одноцентровое, открытое, 2-этапное, I фазы. Для обеспечения мощности статистического теста не менее 80 % при уровне значимости 5 % был выбран размер выборки — 24 здоровых добровольца женского пола.

Концентрации ФСГ в сыворотке крови определяли при ИФА на основе набора производства компании DRG Instruments GmbH, Германия (кат. номер EIA-1288).

Период скрининга включал в себя подготовительный этап, во время которого добровольцы принимали препарат Ярина по 1 таблетке в сутки с целью подавления эндогенной продукции гонадотропных гормонов в течение 6 недель (всего 42 дня). За 1 день до введения одного из исследуемых препаратов у добровольцев производили забор крови для определения концентрации эндогенного ФСГ. В случае, если по результатам проведенного анализа уровень ФСГ составлял 5 МЕ/л и менее (достаточное подавление эндогенной продукции гонадотропинов), добровольцев приглашали в исследовательский центр для дальнейшего участия в исследовании. В случае, если концентрация ФСГ оказывалась выше 5 МЕ/л, добровольцев исключали из исследования и заменяли их дублерами. После подготовительного периода добровольцы, у которых концентрация ФСГ была 5 МЕ/л и ниже, продолжали прием Ярина в течение каждого из 2 этапов. Распределение добровольцев на 2 группы проводили согласно рандомизационной схеме протокола исследования. Исследование состояло из 2 равнозначных этапов: на I этапе исследования добровольцам, вошедшим в 1 группу, подкожно вводили 300 МЕ исследуемого препарата; добровольцам 2 группы — препарат сравнения (Гонал-ф). На II этапе исследования добровольцам 1 группы вводили препарат сравнения; добровольцам 2 группы — исследуемый препарат. Подкожное введение препаратов в дозе 300 МЕ осуществлялось дважды за время исследования с интервалом в 10 дней. Фармакокинетические параметры определяли, исходя из данных о концентрациях ФСГ в сыворотке крови добровольцев после однократного введения 300 МЕ каждого из сравниваемых препаратов. Забор крови осуществляли в определенные временные точки по указанной схеме: – 20 мин (за 20 мин до введения препарата), 0 ч (непосредственно перед введением), через 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 36, 48, 72, 120, 168 и 192 ч после каждого введения препарата. После окончания второго этапа исследования оценивали изменения общего состояния каждого добровольца, произошедшие в ходе исследования, включая измерение основных жизненных показателей; ЭКГ; клинический и биохимический анализы крови; коагулограмму; общий анализ мочи. Статистическая обработка результатов фармакокинетического анализа проведена с помощью программного пакета Phoenix 6.4 (Certara, США). Сравнение первичных фармакокинетических параметров AUC_{0-192} и C_{max} проведено методом дисперсионного анализа (ANOVA).

3.12. Получение конъюгата инсулина и полисиаловой кислоты

Окисленная полисиаловая кислота со средним молекулярным весом 14,1 кДа (очистка до показателей «clinical grade») была приобретена в Serum Institute of India (India).

Биосинтетический инсулин человека (Инсуран, ИБХ РАН) был любезно предоставлен д.б.н. Д.И. Байрамашвили (ИБХ РАН).

Конъюгирование инсулина и окисленной полисиаловой кислоты 14,1 кДа проводили при +37°C в растворе 50% диметилсульфоксида, 100 мМ фосфатов натрия, pH=7,8 в присутствии 63 мМ (4 мг/мл) NaCNBH₃. Окисленная полисиаловая кислота использовалась в конечной концентрации 20%, инсулин – 2% (молярное соотношение кислоты к полипептиду около 3:1). pH реакционной смеси довели до 7,8 немедленно после смешивания всех компонентов при помощи NaH₂PO₄, соответственно.

Аликвоты реакционной смеси отбирали каждые 10-30 мин, останавливали реакцию добавлением Tris-HCl pH=7,5 до 100 мМ, добавляли ацетонитрил до 5% и анализировали методом обращеннофазовой хроматографии при помощи колонки SOURCE RPC 9 ST 150x4.6 мм (GE Healthcare). Аналитическое разделение проводили в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (5-45% за 50 мин, скорость потока 1 мл/мин), температура колонки 40°C. В качестве ион-парного агента к обоим растворам добавляли трифторуксусную кислоту (TFA) до 0,1%. Все хроматографические разделения проводили при помощи хроматографа Breeze (Waters), сбор данных вели на длинах волн 280 и 214 нм, анализ хроматограмм вели при помощи программного обеспечения Empower 2 (Waters).

Тестирование гипогликемического действия конъюгата проводили на мышях линии Balb/c, введение всех вариантов инсулина проводили в/в, в хвостовую вену, отбор крови для определения уровня глюкозы проводили из орбитального синуса. Тестирование уровня глюкозы вели при помощи портативного глюкометра OneTouch Select ()

3.13. Получение конъюгата оксинтомодулина с полисиаловой кислотой

Окисленная полисиаловая кислота со средним молекулярным весом 14,1 кДа (очистка до показателей «clinical grade») была приобретена в Serum Institute of India (India). Лиофилизированный биосинтетический оксинтомодулин человека (ОХМ) был получен согласно [276] и любезно предоставлен к.б.н. Р.С. Есиповым (ИБХ РАН). Эндопротеиназа Asp-N из *Pseudomonas fragi* производства Sigma была растворена в воде в конечной концентрации 40 нг/мкл, разделена на аликвоты и хранилась при температуре ниже минус 80 оС, рекомбинантная дипептидиламинопептидаза IV (DPP-IV) была производства Sigma, растворители для препаративной и аналитической хроматографии качества "gradient grade" (Sigma). Тестирование уровня потребления пищи проводилось для мышей линии C57BL/6N,

полученных из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН. Все эксперименты с животными проводились согласно требованиям действующего законодательства.

3.13.1. Синтез конъюгата ОХМ с полисиаловой кислотой

Конъюгирование ОХМ и окисленной полисиаловой кислоты 14,1 кДа проводили при +37°C в растворе 100 мМ фосфатов натрия, рН=7,8, либо в растворе 100 мМ ацетата натрия рН=6,0 в присутствии 63 мМ (4 мг/мл) NaCNBH_3 . Окисленная полисиаловая кислота использовалась в конечной концентрации 10%, ОХМ – 1% (молярное соотношение кислоты к полипептиду около 3:1). рН реакционной смеси доводили до 7,8 или 6,0 немедленно после смешивания всех компонентов при помощи NaH_2PO_4 или уксусной кислоты, соответственно.

Аликвоты реакционной смеси отбирали каждые 10-30 мин, останавливали реакцию добавлением Tris-HCl рН=7,5 до 100 мМ, добавляли ацетонитрил до 5% и анализировали методом обращеннофазовой хроматографии при помощи колонки SOURCE RPC 9 ST 150x4.6 мм (GE Healthcare). Аналитическое разделение проводили в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (5-45% за 50 мин, скорость потока 1 мл/мин), температура колонки 40°C. В качестве ион-парного агента к обоим растворам добавляли трифторуксусную кислоту (TFA) до 0,1% или триэтиламин гидрохлорид (TEA), рН=6,0 до 0,05%. Все хроматографические разделения проводили при помощи хроматографа Breeze (Waters), сбор данных вели на длинах волн 280 и 214 нм, анализ хроматограмм вели при помощи программного обеспечения Empower 2 (Waters).

3.13.2. Получение очищенного конъюгата

Конъюгат ОХМ и полисиаловой кислоты 14,1 кДа (PSA-OXM) очищали от примесей при помощи двух раундов хроматографии. Немедленно после завершения реакции к смеси добавляли этанол до 5% и TEA до 0,05%, образец наносили на колонку размером 10x100 мм с сорбентом SOURCE RPC 15 (GE Healthcare), уравновешенную раствором 5% этанола, 0,05% TEA в воде. Свободную полисиаловую кислоту и соли удаляли промывкой колонки тремя объемами стартового раствора и вели элюцию PSA-OXM в линейном градиенте концентрации этанола - 5-45% за 50 мин при скорости потока 2 мл/мин. Препаративное разделение вели при помощи хроматографа Akta Purifier 900 (GE Healthcare).

Фракции, содержащие только PSA-OXM по данным аналитической хроматографии, объединяли и наносили на колонку 10x100 мм с сорбентом SOURCE Q 30 (GE Healthcare), уравновешенную раствором 20 мМ фосфата натрия, рН=7,4. Конъюгат элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl (0-500 мМ NaCl за 50 мин при скорости потока

3 мл/мин). Фракции, содержащие конъюгат состава 1:1, и не содержащие PSA с малой длиной цепи, объединяли, концентрировали ультрафильтрацией при помощи центрифужных концентраторов VivaSpin 6 с порогом отсечения мембраны 5 кДа, диалитировали к фосфатно-буферизованному раствору, стерилизовали раствор фильтрацией и хранили в аликвотах в замороженном виде.

Концентрацию конъюгата, то есть полипептида в составе конъюгата измеряли при помощи ОФ-ВЭЖХ, используя длину волны 280 нм и раствор немодифицированного ОХМ в качестве стандарта. Концентрацию PSA в конъюгате измеряли по методу Свеннерхольма, описанному в [236].

3.13.3. Химическое десиалирование PSA-OXM

Полный гидролиз цепи PSA проводили при помощи обработки муравьиной кислотой. Оптимальные условия реакции были определены как 1 час инкубации PSA-OXM с 0,3 М муравьиной кислотой при 80 °С. По окончании реакции кислота была нейтрализована добавлением 1,5-кратного молярного избытка NH_4HCO_3 . Де-полисиалированный конъюгат PSA-OXM очищали от примесей при помощи аналитической узкопористой колонки Symmetry C18 4.6x150 мм, ион-парный агент – TFA. Основной пик, соответствующий десиалированному PSA-OXM собирали, нейтрализовали TFA добавлением раствора NH_4HCO_3 до 100 мМ, высушивали лиофилизацией в вакуумной центрифуге и растворяли в деионизованной воде.

3.13.4. Пептидное картирование при помощи протеазы Asp-N

Протеазу Asp-N растворяли в 20 мМ Tris-HCl, pH=8,5 и добавляли по 300 нг к раствору образцов интактного ОХМ, PSA-OXM и дегликозилированного PSA-OXM в 100 мМ NH_4HCO_3 , по 60 мкг полипептида в каждом (массовое отношение фермент:субстрат 1:200), конечная концентрация полипептида 500 мкМ. Исчерпывающий гидролиз вели при 37 °С в течение 16 ч, ожидаемый паттерн фрагментации ОХМ - $\text{H}_1\text{SQGTFTS}_8$ | $\text{D}_9\text{YSKYL}_{14}$ | $\text{D}_{15}\text{SRRAQ}_{20}$ | $\text{D}_{21}\text{FVQWLMNTRNRNIA}_{37}$.

Аликвоты реакционной смеси объемом 5 мкл подвергали прямому анализу методом MALDI-TOF, остаток наносили на колонку Symmetry C18 150мм x 4.6мм, уравновешенную раствором 5% ацетонитрила, 0,1% TFA в воде. Пептидные фрагменты разделяли в градиенте концентрации ацетонитрила от 5% до 55% за 25 мин при скорости потока 0,4 мл/мин. Собирали фракции элюата, соответствующие основным пикам, высушивали в вакуумной центрифуге, перерастворяли в 50% ацетонитриле в воде и использовали для анализа методом

MALDI-TOF, используя матрицу 5-дигидрокси бензойную кислоту. Масс-спектрометрический анализ вели при помощи инструмента ULTRAFLEX TOF/TOF (Bruker Daltonics) с источником молекулярных ионов ScoutMTP MALDI и программного обеспечения flexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics).

3.13.5. Ограниченный протеолиз при помощи протеазы DPP-IV

Образцы интактного OXM и PSA-OXM, содержащие по 10 мкг полипептида в концентрации 360 мкМ, гидролизовали рекомбинантной протеазой DPP-IV, взятой в диапазоне концентраций 92,5 – 2900 мЕД/мл (около 78 – 5000 нг/мл) в течение 20 ч при температуре +37°C в растворе 50 мМ Tris-HCl, pH=7,5. Реакцию останавливали добавлением ацетонитрила до 5% и TFA до 1%. Контрольные образцы инкубировали в тех же условиях без добавления протеазы. Аликвоты реакционных смесей анализировали при помощи ОФ-ВЭЖХ с широкопористой колонкой, как указано выше, используя TEA в качестве ион-парного агента. Степень распада OXM вычисляли как отношение объема пика основного продукта деградации к сумме объемов пиков продукта деградации и интактного полипептида (либо интактного конъюгата).

3.13.6. Определение активности PSA-OXM на животной модели

Шестьдесят самцов мыши, порода C57BL/6N, возрастом 8 недель, вес 21-24 г, содержали в индивидуальных клетках в помещении с контролируемой температурой (20-24 оС) и освещенностью (12/12 ч циклы дня-ночи с периодом освещения с 08:00 до 20:00). Доступ к воде и пище не ограничивался, если не указано иное, стандартная диета для грызунов RM#1 (Special Diet Service, Witham, UK).

После поступления в виварий все животные акклиматизировались в течение 10 дней. Для уменьшения стрессорного воздействия на потребление пищи в день проведения эксперимента все животные ежедневно обрабатывались одинаковым образом подготовленным специалистом согласно рекомендациям [277]. Адаптационные процедуры включали в себя взятие в руки и взвешивание животных в начале светового дня (08:00-08:15) и многократное взвешивание корма в кормушке. За 6 дней и за 3 дня до эксперимента животные получали инъекции плацебо-раствора также в начале светового дня (08:15-08:30) – по 125 мкл стерильного фосфатно-буферизованного раствора внутривентрально при помощи иглы 29-gauge. Растворы OXM и PSA-OXM вводили при помощи 1 инъекции из расчета 100 мкл на 20 г веса животных, вводимый объем был скорректирован по фактическому весу животных, но не более 125 мкл.

Для оценки анорексигенного эффекта PSA-OXM и его динамики использовали модель острого пищевого поведения, лишив животных перед началом опыта доступа к пище с 16:00 дня, предшествующего эксперименту. В начале светового дня (08:15-08:30) была сделана 1 интраперитонеальная инъекция OXM или PSA-OXM или плацебо-раствора (n=10-12 для каждой группы). Непосредственно после инъекции мышей возвращали в их клетки, снабженные кормушками с предварительно взвешенными порциями корма. Потребление корма измеряли регулярным взвешиванием корма в кормушках согласно [257]. Интервалы времени между измерениями были установлены как 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150 мин и 3, 4, 8 ч. Контрольная инъекция свободной PSA была проведена для 25 мышей возраста 6 недель (17-20 г), разделенных на 2 группы и подготовленных к эксперименту как указано выше. Обработка данных для модели пищевого поведения проводилась при помощи двустороннего статистического дисперсионного анализа с последующей *post-hoc* проверкой по критерию Даннета в программе Statistica 6.1.

4. Результаты исследования

Получение линий-продуцентов факторов свертывания крови VII, VIII, IX проводилось в лаборатории биокатализа ИБХ РАН с 2004 г. до 2012 г., часть работ по анализу продуцента фактора свертывания крови IX и все работы по получению линий-продуцентов ФСГ и ЛГ выполнялись в лаборатории биоинженерии клеток млекопитающих ФИЦ Биотехнологии РАН с 2012 г по 2019 г. Разработка методов получения гликоконъюгатов проводилась в лаборатории биокатализа ИБХ РАН в 2007-2010 г., препаративный синтез конъюгата инсулина с полисиаловой кислотой был проведен в лаборатории биоинженерии клеток млекопитающих ФИЦ Биотехнологии РАН. Исследования каталитических антител проводились в лаборатории биокатализа ИБХ РАН.

4.1. Создание линии клеток-продуцентов фактора VII в клетках линии ВНК при помощи стандартной векторной плазмиды

Вследствие того, что молекула фVIIa человека должна содержать ряд пост-трансляционных модификаций, биологически активный фVIIa может быть получен только в культивируемых клетках млекопитающих, при этом стандартная линия клеток СНО не подходит для его биосинтеза из-за недостаточной активности фермента витамин-К-оксиредуктазы (VKORC), обеспечивающего восстановление кофактора для фермента,

проводящего пост-трансляционное превращение остатков глутаминовой кислоты в Gla в составе Gla-домена фVII. Оригинальный препарат фVIIa был получен при помощи другой линии клеток – ВНК 21, полученных из сирийского хомячка (*Mesocricetus auratus*). Было предположено, что для воспроизведенного препарата фVIIa также должна быть использована линия клеток ВНК 21 и плазмидный вектор с эукариотическим промотором гена домашнего хозяйства для обеспечения высокого и постоянного уровня экспрессии целевого гена.

Область ОРС кДНК фактора VII была получена путем ОТ-ПЦР из мРНК, выделенной из культивируемых клеток человека HepG2. Полностью верифицированный секвенированием области вставки плазмидный клон был использован для переноса области ОРС фVII в экспрессионный вектор pEFZeo, полученный переносом области кассеты гена устойчивости к действию антибиотика блеомицин (Зеоцин) из плазмиды pSV40/Zeo (Invitrogen, США) в плазмиду pEF1 (Invitrogen, США), содержащий коровью область промотора гена фактора элонгации трансляции 1 альфа (EEF1A1, EF), первый некодирующий экзон гена EEF1A1 и первый интрон, а также область сигнала полиаденилирования и терминации транскрипции из гена гормона роста быка. Полученная плазида pEFZeoF7 (Рис. 10) была повторно верифицирована полным секвенированием области целевого гена, линеаризована при помощи эндонуклеазы рестрикции PvuI и использована для трансфекции клеток ВНК 21.

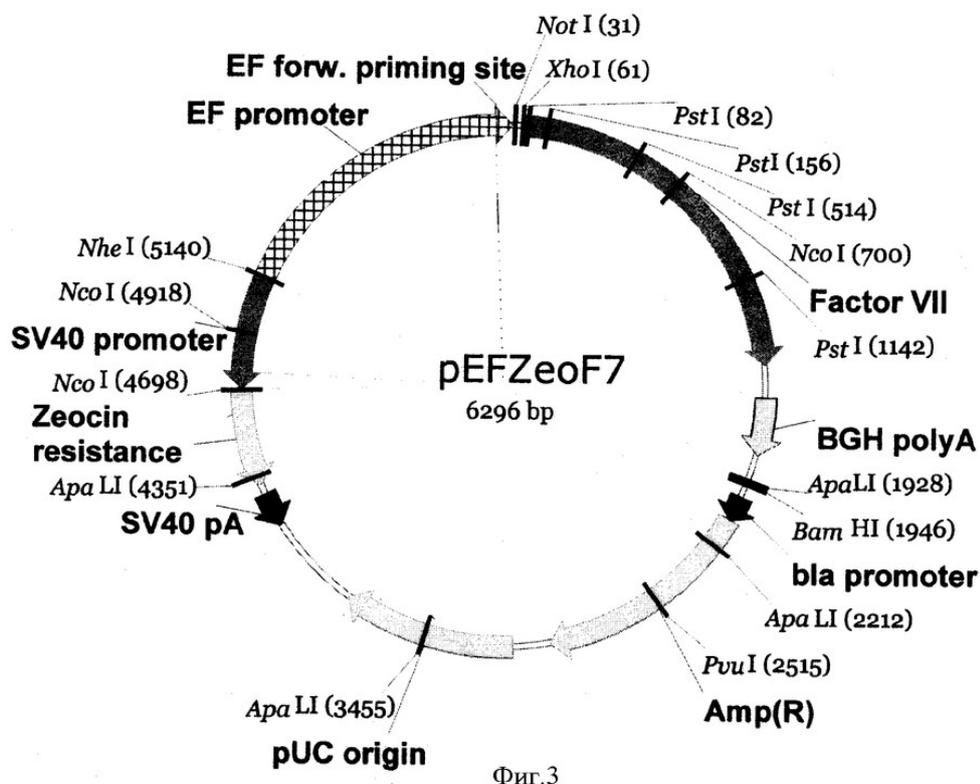


Рисунок 10. Схема экспрессионной плазмиды pEFZeoF7. Обозначения: EF promoter – коровий промотор гена EF1 человека, Factor VII – ОРС фVII человека, BGH polyA – сайт полиаденилирования гена гормона роста быка, bla prom – промотор гена β-лактамазы, Amp(R) – ОРС β-лактамазы, pUC origin –

бактериальная область начала репликации, SV40 pA – сайт полиаденилирования и терминатор транскрипции из лизирующего вируса обезьяны SV40, Zeocin resistance – OPC фермента устойчивости к действию блеомицина (Зеоцина), SV40 promoter – промотор SV40. Направление транскрипции генов указано стрелками.

Клетки после трансфекции культивировали в лунках микропланшетов как прикрепленную культуру, селекцию стабильно трансфицированных клеток проводили в присутствии зеоцина, 0,5 мг/мл, микроскопически наблюдали рост колоний после 10 дней культивирования с заменой среды каждые 3-4 дня. При помощи ИФА были определены лунки, для которых концентрация фVII в культуральной среде была максимальной, все колонии клеток в этих лунках были диссоциированы и использованы для клонирования методом предельных разведений в 96-луночных планшетах.

Среди клональных линий-продуцентов фVII человека были отобраны несколько линий с максимальной общей продуктивностью. Для одной из них – ВНК/F7 конечная концентрация целевого белка составила 20-40 мг/л при культивировании в присутствии 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота до момента распада монослоя клеток. Данная клеточная линия была использована для получения фVII в бессывороточной среде в условиях роллерного культивирования.

Удельная прокоагуляционная активность фVIIa определяется состоянием его Gla-домена, нормальное функционирование которого необходимо для Ca²⁺-опосредованного взаимодействия фVIIa с мембранами клеток при формировании комплекса теназы внешнего пути свертывания. Известно, что полной прокоагуляционной активностью обладают только молекулы фVIIa, в которых все 10 остатков Glu в составе Gla-домена конвертированы в карбоксильные остатки Gla[278]. Можно предположить, что при получении рекомбинантного фVII в культивируемых животных клетках, особенно при высокой скорости его секреции, часть остатков Glu не будет конвертирована в Gla и разделение таких форм фVII при очистке при помощи стандартных хроматографических методов может представлять собой нетривиальную задачу. Характерной особенностью Gla-домена является сильное изменение его конформации при связывании ионов Ca²⁺, вследствие этого некоторая часть антител против фVII будет связывать его только в присутствии Ca²⁺ и терять способность к связыванию при добавлении хелатирующих агентов, например ЭДТА-Na. Такие моноклональные антитела были успешно получены для белка C, фVII и других белков с Gla-доменом, в случае фVII эпитоп одного из Ca-зависимых антител был определен как остатки 3-10 [279]. Поскольку существующие Ca-зависимые мкАт и продуцирующие их гибридомные клоны не распространяются свободно на коммерческой основе, для целей настоящей работы было проведено создание собственной панели мкАт против фVIIa и при

помощи ИФА были определены антитела, связывающие фVIIa сильнее в присутствии 1 мМ CaCl₂, чем в присутствии 1 мМ ЭДТА-Na. Низкие концентрации обоих веществ были применены для быстрой оценки степени зависимости связывания от присутствия ионов Ca, при обычном применении таких мкАт в аффинной очистке фVII концентрации CaCl₂ и ЭДТА-Na обычно выше примерно в 10 раз. Было обнаружено 6 клонов мкАт, изменяющих свои свойства в зависимости от присутствия ионов кальция, среди них было отобрано 3 клон с максимальным изменением сигнала в ИФА – 4F4, 6B8 и 5D9. Для них были получены прототипы аффинных сорбентов с использованием BrCN – активированной сефарозы 4FF, NHS-сефарозы, эпокси-активированной сефарозы и карбокси-реактивной EAH сефарозы. Присоединение очищенных мкАт к сорбентам вели в рекомендованных производителями условиях без оптимизации протоколов в соотношении 5 мг мкАт на 1 мл сорбентов, было установлено, что степень конъюгации мкАт близка к 100% для всех сорбентов, кроме эпокси-активированной сефарозы (80-85%). При проверке статической емкости полученных сорбентов и степени элюции фVIIa при нейтральном pH под действием 30 мМ цитрата натрия было обнаружено, что максимальная емкость при приемлемой степени элюции продукта достигается для NHS-сефарозы и мкАт 6B8 и 4F4 (Таб 14).

Таблица 14. Статическая емкость и степень элюции фVIIa для вариантов иммуносорбентов.

Сорбенты	Емкость, мг/мл	Выход фактора VII, %
6B8 BrCN Sepharose 4 FF	0,51	34,05
5D9 BrCN Sepharose 4 FF	0,46	10,32
4F4 BrCN Sepharose 4 FF	0,21	35,16
6B8 NHS Sepharose 4 FF	0,74	53,4
5D9 NHS Sepharose 4 FF	0,38	58,54
4F4 NHS Sepharose 4 FF	0,76	46,5
6B8 EAH Sepharose 4B	0,35	<1
5D9 EAH Sepharose 4B	0,13	<1
4F4 EAH Sepharose 4B	0,21	<1

Примечание: серым цветом обозначены наиболее эффективные сочетания емкости сорбента и выхода целевого белка

Вследствие того, что для 2 отобранных мкАт была обнаружена относительно высокая емкость, но сниженная (по сравнению с третьим мкАт) способность к элюции фVIIa при нейтральном pH, был получен «смешанный» иммуносорбент, в котором к NHS-сефарозе присоединяли одновременно мкАт 6B8 и 4F4. Для такого сорбента статическая емкость при адсорбции фVII из культуральной среды составила 0,5 мг/мл, а выход продукта при элюции цитратом натрия – 68%, что сочли приемлемым для последующего промышленного

применения. Предположительно, увеличение степени элюции в полученном смешанном сорбенте вызвано снижением плотности посадки для каждого из двух антител и уменьшением вероятности их кооперативного взаимодействия с молекулами фVIIa или фVII.

Была произведена оценка динамической емкости полученных сорбентов при связывании целевого белка суспензией сорбента в перемешиваемых пробирках. Для времени контакта 5 мин было обнаружено, что доля несвязавшегося с сорбентами фVII из концентрата культуральной среды составляет 9,7% для мкАт 6B8, 10,1% для мкАт 4F4 и менее 5% (ниже предела обнаружения) для «смешанного» сорбента. При проведении аффинной хроматографии на колонке для времени контакта 10 мин было также установлено, что доля несвязавшегося фVII составляет 2,6% при уровне нагрузки колонки около 0,5 мг/мл сорбента. Таким образом, полученный аффинный сорбент может быть использован при очистке больших количеств фVII из концентрата культуральной среды.

Общая использованная схема очистки фVII состояла в последовательных стадиях ультрафильтрации/диафильтрации на мембране из полиэфирсульфона с порогом отсечения 10 кДа в присутствии 0,1% Твин-20, анионообменной хроматографии на сорбенте Q Sepharose FF, аффинной хроматографии с адсорбцией продукта в присутствии CaCl₂ и элюции в присутствии цитрата натрия, аутокаталитической активации фVII до фVIIa в процессе второй анионообменной хроматографии и финишной ультрафильтрации/диафильтрации.

При опытно-промышленной культивации продуцента фVII было обнаружено, что в условиях роллерного культивирования с периодической сменой бессывороточной среды клеточная линия ВНК/F7 развивала значительно меньшую продуктивность и выход конечного продукта не превышал 3 мг с одного литра среды, что приблизительно соответствовало продуктивности клеточной линии, использованной в получении оригинального лекарственного средства фVIIa НовоСэвен (0,18 мг/л для 2 дней культивирования прикрепленной культуры по данным [280] и 0,02-0,2 мг/л по данным патента США 4784950). Такая относительно невысокая продуктивность была вызвана невозможностью адаптации клеточной линии ВНК 21 и ее производных к постоянному суспензионному культивированию в бессывороточной среде и необходимостью вести наработку продукта в течение небольшого времени в добавляемых к адгезионной культуре порциях бессывороточной среды. Биологическая активность фVIIa была исследована на животной модели состояния острого кровотечения, была продемонстрирована биоэквивалентность для оригинального препарата фVIIa НовоСэвен и продукта клеточной линии ВНК/F7.

Таким образом, было установлено, что экспрессионные плазмиды на основе промотора гена фактора элонгации трансляции 1 альфа (в данном случае – коровая область промотора гена EF1 человека) не уступают наиболее распространенным в биофармацевтической индустрии плазидам на основе вирусных промоторов при получении промышленно пригодных линий-продуцентов гликопротеинов, однако и не превосходят их по удельной продуктивности результирующих клеточных линий. Был получена линия продуцент фVII человека и разработан полный процесс его очистки и активации до фVIIa, получаемый продукт демонстрировал надлежащую биологическую активность.

Изначально нами было предположено, что удельная продуктивность клеточных линий может быть увеличена путем проведения амплификации интегрированных в геном плазмид, содержащих маркер устойчивости к действию метотрексата – дигидрофолатредуктазу мыши. Проверка этого предположения была выполнена на примере негомологичного фVII фактора свертывания крови VIII человека, получение которого в существенных количествах являлось известной биотехнологической задачей, не имевшей хорошего решения.

4.2. Создание линии продуцента фактора VIII с делецией В-домена на базе стандартной экспрессионной системы в клетках линии СНО

Основным недостатком существующих методов получения рекомбинантного фVIII является крайне низкий уровень экспрессии, вызванный большим размером целевого белка и сложным набором пост-трансляционных модификаций. При удалении домена В, составляющего значительную часть молекулы фVIII, удельная прокоагуляционная активность фVIII и его период полураспада в плазме крови практически не падают. Замена домена В на короткий линкерный пептид, обозначаемый как SQ, приводит к существенному увеличению уровня продукции фVIII в клетках СНО и почти полному протеолитическому процессингу белка-предшественника до зрелой двухцепочечной формы. Медицинский препарат фVIII с делецией домена В (фVIII BDD SQ) и несколько аналогичных препаратов с другими вариантами линкерного пептида допущены к медицинскому применению, его показатели эффективности и безопасности аналогичны таковым для препаратов полноразмерного рекомбинантного фVIII. Типичные опубликованные уровни продуктивности для клеток линии СНО, продуцирующих фVIII BDD SQ, составляли 0,5-2 МЕ/мл, что соответствует концентрации фVIII около 0,2 мкг/мл и на несколько порядков

уступает продуктивности промышленных продуцентов других рекомбинантных факторов свертывания крови (VII, IX).

3.2.1. Создание экспрессионных конструкций делеционного мутанта фVIII

Экспрессионная конструкция pOptivec/F8, кодирующая полноразмерный фVIII, была создана на основе вектора pOptivec-TOPO (Invitrogen, США). При клонировании варианта фVIII BDD SQ минимизировали использование ПЦР для снижения вероятности возникновения мутаций (Рис. 11). Для получения стабильных линий-продуцентов использовали линейризованные плазмиды с разрушенным геном β-лактамазы.

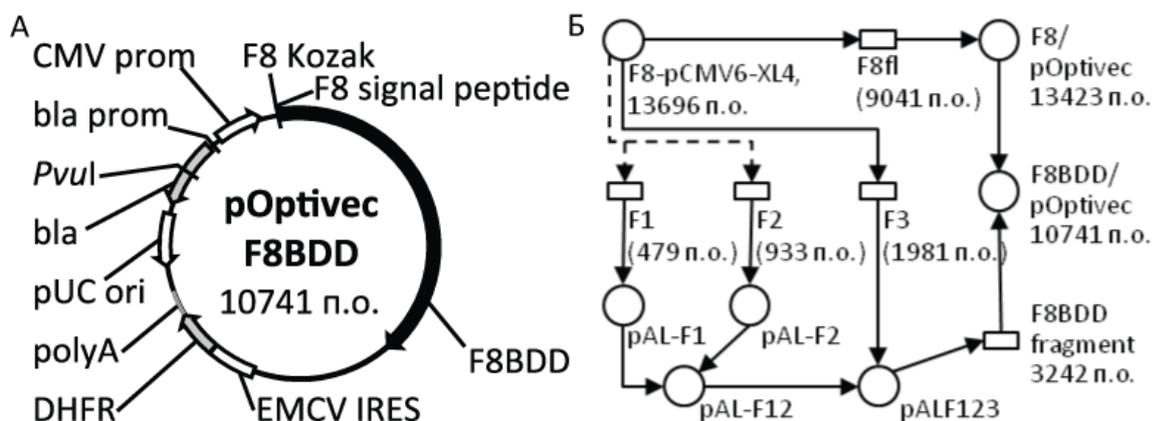


Рисунок 11. Карта экспрессионной плазмиды pOptivec/F8BDD и общая схема клонирования
 CMV-prom – цитомегаловирусный промотор, F8 Kozak – природная последовательность Козак гена *FVIII*, F8 signal peptide – последовательность, кодирующая природный сигнальный пептид фVIII, F8BDD – OPC фVIII BDD SQ, EMCV IRES – внутренний участок связывания рибосом EMCV, DHFR– OPC дигидрофолатредуктазы, polyA – сигнал полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота, pUC ori – бактериальная область начала репликации, bla – OPC β-лактамазы, bla prom – промотор гена β-лактамазы. Направление транскрипции генов указано стрелками. Б. Прямоугольники - линейные фрагменты ДНК, круги – плазмиды. Стадии ПЦР показаны пунктирной линией, рестрикции-лигирования – сплошной.

4.2.2. Получение и характеристика линии-продуцента BDD-фVIII

Дефектные по *dhfr* клетки CHO DG-44 трансфицировали линейризованной плазмидами в бессывороточной среде с использованием реагента, свободного от продуктов животного происхождения. Популяции стабильно трансфицированных клеток получены во всех случаях после культивирования трансфицированных клеток в селективной среде в течение 15–20 дней.

Концентрацию секретированного фVIII определяли методом ИФА. Для полноразмерного фVIII все три популяции секретировали менее 10 МЕ/л фVIII. Для делеционного варианта была обнаружена популяция с уровнем секреции BDD-фVIII 71 ± 10 МЕ/л, которая использовалась для амплификации трансгена.

Клетки выбранной популяции подвергали воздействию селекционного агента - метотрексата (MTX), начиная с концентрации 25 нМ. После стабилизации культуры

концентрацию MTX удваивали и продолжали амплификацию (Рис. 12). Не обнаружено плавного подъема уровня секреции BDD-фVIII в течение всего курса амплификации, максимальный уровень BDD-фVIII в кондиционированной среде получен после пяти последовательных шагов амплификации (0,5 мкМ MTX). Дальнейшее увеличение концентрации MTX привело к немедленному падению уровня секреции продукта в 10 раз с последующим возвращением к величинам, примерно соответствующим исходной культуре стабильно трансфицированных клеток (74 ± 6 МЕ/л для 16 мкМ MTX). Это явление предположительно обусловлено увеличением в популяции доли непродуцирующих клеток, содержащих измененную бицистронную мРНК [281] или амплифицированные «посторонние» гены, например ген множественной лекарственной устойчивости, кодирующий гликопротеин P [282].

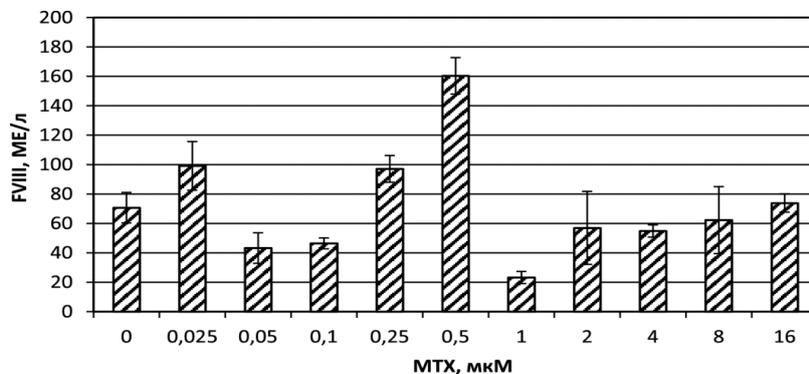


Рисунок 12. Уровень секреции BDD-фVIII в конфлюентных клеточных популяциях по данным ИФА. Измерения проводили в двух повторностях, погрешности указаны для доверительных интервалов 95%.

Популяцию клеток с максимальным уровнем продукции BDD-фVIII, полученную в присутствии 0,5 мкМ MTX, использовали для клонирования клеток-продуцентов методом предельного разведения (Таб. 15).

Таблица 15. Секреция BDD-фVIII 10 наиболее продуктивными клональными клеточными линиями

Клональная линия, номер	18	22	17	9	1	2	15	3	4	16
Секретируемый BDD-фVIII, МЕ/л*	502	475	434	416	410	399	395	379	378	375

*Концентрацию секретированного продукта измеряли для прикрепленных культур в момент достижения конфлюентности.

Не было зафиксировано существенного падения уровня BDD-фVIII в двух клональных линиях, #18 и #22, при продолжительном культивировании в течение 30 дней. Более продуктивную линию #18 выбрали для дальнейшего использования. Секретируемый BDD-фVIII из кондиционированной среды и клеточных лизатов отобранной клональной

линии, названной DG-BDDфVIII-18, был охарактеризован методом иммуноблоттинга (Рис. 13).

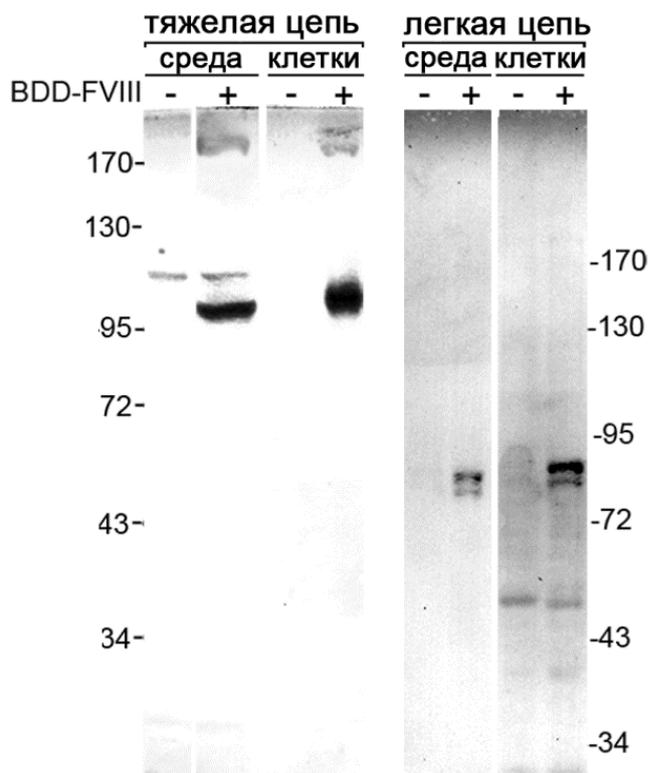


Рисунок 13. Иммуноблоттинг секретированного и внутриклеточного BDD-фVIII. «тяжелая цепь» и «легкая цепь» – гибридизация с моноклональными антителами к тяжелой и легкой цепи фVIII соответственно; «BDD-фVIII-» и «BDD-фVIII+» – образцы, соответствующие нетрансфицированным клеткам CHO DG-44 и клеткам линии DG-BDDFVIII-18, соответственно. Приведенные для каждого из антител дорожки соответствуют одной мембране, разделение в 7.5% ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях, молекулярные массы указаны в кДа.

Основная часть секретированного BDD-фVIII и его внутриклеточного белка-предшественника была процессирована до двухцепочечной формы. Подвижность полос тяжелой и легкой цепи при ДСН-ПААГ соответствовала подвижности цепей BDD-фVIII, определенной ранее Келли и соавторами [283].

Прокоагуляционная активность BDD-фVIII в кондиционированной среде составила 0,47 МЕ/мл, а уровень антигена фVIII в этом образце, измеренный при помощи ИФА, составил 0,52 МЕ/мл. Секретируемый клональной клеточной линией DG-BDDFVIII-18 фVIII обладает полной удельной прокоагуляционной активностью.

4.2.3. Получение мкАт для препаративной очистки фVIII

Типичная схема промышленной очистки белка BDD-фVIII включает в себя четыре стадии обычной хроматографии и одну стадию аффинной хроматографии [283]. Таким образом, ключевым компонентом всего процесса может быть мкАт, способное связывать

BDD-фVIII из культуральной среды или из промежуточного концентрата и диссоциировать с целевым белком в неденатурирующих условиях элюции. Типичным реагентом, пригодным для элюции фVIII с иммуноаффинных колонок, является раствор 50% этиленгликоля в ФБР [284].

Моноклональные антитела для аффинной очистки BDD-фVIII были отобраны путем скрининга гибридомных клонов (продуцирующих антитела к фVIII) при помощи ИФА. Лунки с комплексами антиген-антитело трижды промывали раствором, содержащим 50% этиленгликоля, а контрольные лунки – раствором ФБР-Твин. В целевых клонах гибридом должно было наблюдаться максимальное снижение уровня сигнала при промывке раствором этиленгликоля. Из 34 клонов гибридом, полученных после одного слияния спленоцитов мыши, иммунизированной фVIII, были отобраны четыре клона с высоким титром специфических антител и максимальной чувствительностью к промывке лунок раствором этиленгликоля (Таб. 16).

Таблица 16. Свойства моноклональных антител к фVIII, чувствительных к этиленгликолю.

Клон	Титр мкАт в асцитной жидкости	Падение сигнала в ИФА при промывке этиленгликолем, %	Динамическая емкость сорбента, МЕ/мл	Степень элюции фVIII, %
A2	1 : 123 000	40	2.6	89
E3	1 : 68 500	39	2.8	89
A4	1 : 27 500	15	1.6	>90
B6	1 : 123 000	35	3.4	86

Все четыре отобранных мкАт избирательно связывались с тяжелой цепью BDD-фVIII при иммуноблоттинге, т.е. узнаваемые этими антителами эпитопы находятся вне домена В. Очищенные мкАт, полученные из асцитной жидкости, были иммобилизованы на активированном N-гидроксисукцинимидом хроматографическом сорбенте (NHS-сефароза) в соотношении 1 мг мкАт на 1 мл осажденного сорбента. Полученные иммуносорбенты использовали для адсорбции BDD-фVIII непосредственно из кондиционированной среды путем перемешивания суспензии сорбента в пробирках в течение 1 ч. В таких условиях наблюдалась неполная адсорбция BDD-фVIII (около 20–30%), но практически весь адсорбированный целевой белок удерживался на сорбенте при промывке ФБР и элюировался 50% раствором этиленгликоля. Уровень фVIII во фракции несвязавшихся белков и во фракциях элюатов измеряли при помощи коагулометрического теста. Присутствие активного фVIII во фракциях элюата указывало на то, что в использованных условиях элюции не

происходит существенного повреждения продукта. Полученные мкАт потенциально пригодны для препаративной иммуноаффинной очистки рекомбинантного фVIII.

Несмотря на то, что применение в стандартной векторной плазмиде рOptiVec маркера устойчивости DFHR действительно позволяет многократно увеличить удельную продуктивность клеток при многостадийной амплификации, результирующие клональные продуценты фVIII не превзошли существовавший на момент выполнения этой части работы мировой уровень. По-видимому, даже сцепление OPC фVIII и OPC DHFR при помощи EMCV IRES в составе одной бицистронной РНК и применение клеток CHO DG44, не обладающих функциональными аллелями гена *dhfr*, не предотвращало полностью эффект «расщепления», т.е. падения удельной продуктивности клеток при повышении концентрации МТХ. Было предположено, что существенное улучшение удельной продуктивности клеток-продуцентов фVIII может быть достигнуто при полном отказе от стандартных векторных плазмид, содержащих коровые промоторы вирусов или генов домашнего хозяйства клетки и замене их на полный ген домашнего хозяйства, в контекст которого были бы встроены OPC целевых генов и селекционных маркеров.

4.3. Дизайн генетических элементов для оригинальной системы экспрессии р.1.1

В качестве элемента, обеспечивающего транскрипционную активность целевого гена, был выбран конститутивный аутологичный промотор CHO, и области, фланкирующие ген *EEF1A1* клеток CHO, впервые описанные в работе [10]. Ограничением векторов, включающих OPC и протяженные регуляторные области, может являться низкая эффективность трансфекции и низкая частота амплификации целевого гена в геноме, вызванная большим размером генетической кассеты и возможностью независимой амплификации гена селекционного маркера. Для уменьшения размера генетической кассеты – создана минимальная плазида (бэжбон), на основе которой собирался экспрессионный вектор. Для увеличения вероятности интеграции и частоты амплификации в вектор ввели фрагмент конкатемера терминальных повторов EBV.

4.3.1. Получение минимального базового вектора рVL

Были сформулированы требования к плазмиде, которую можно использовать как основу для создания экспрессионного вектора, среди которых: 1) минимальный размер, 2) высокая копияность в бактериях, 3) пригодность для клонирования сложных последовательностей.

Для создания минимального базового вектора был применен метод инвертированной ПЦР с использованием длинных адапторных праймеров. Был получен базовый вектор – транскрипционно-неактивный и содержащий удобный для дальнейшей сборки фрагментов полилинкер.

4.3.2 Получение фланкирующих областей гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка

Ген китайского хомячка *EEF1A1* и фланкирующие его области были клонированы и депонированы в публичную базу данных GenBank под номером AY188393 авторами работы (Running Deer and Allison 2004), показавшими также, что два фрагмента AY188393, соответствующие позициям 8532–12603 и 14545–18794, содержат все необходимые элементы для стабильной экспрессии гетерологичных белков в клетках млекопитающих. Для получения данных районов нами была применена стратегия модульной сборки (рис. 4). При помощи разработанной нами программы BIOF фланкирующие районы гена *EEF1A1* были поделены на 5 и 6 модулей. Небольшая длина модулей (<0,8 т.п.о.) позволяла определять нуклеотидную последовательность фрагментов до их сборки, то есть быстро и экономично получить полностью корректную последовательность целевых геномных участков.

Разработанная в ходе решения этой задачи программа BIOF для разбиения геномных последовательностей на модули, содержащие гибридные рестриктные сайты, распространяется на условиях лицензии GNU GPL, программа и ее исходный код доступен по адресу <http://sourceforge.net/projects/biof/>. Данная стратегия клонирования (MAC, рис. 4) может применяться для других приложений, например, для получения ОРС редких транскриптов в ходе *in vitro* сплайсинга.

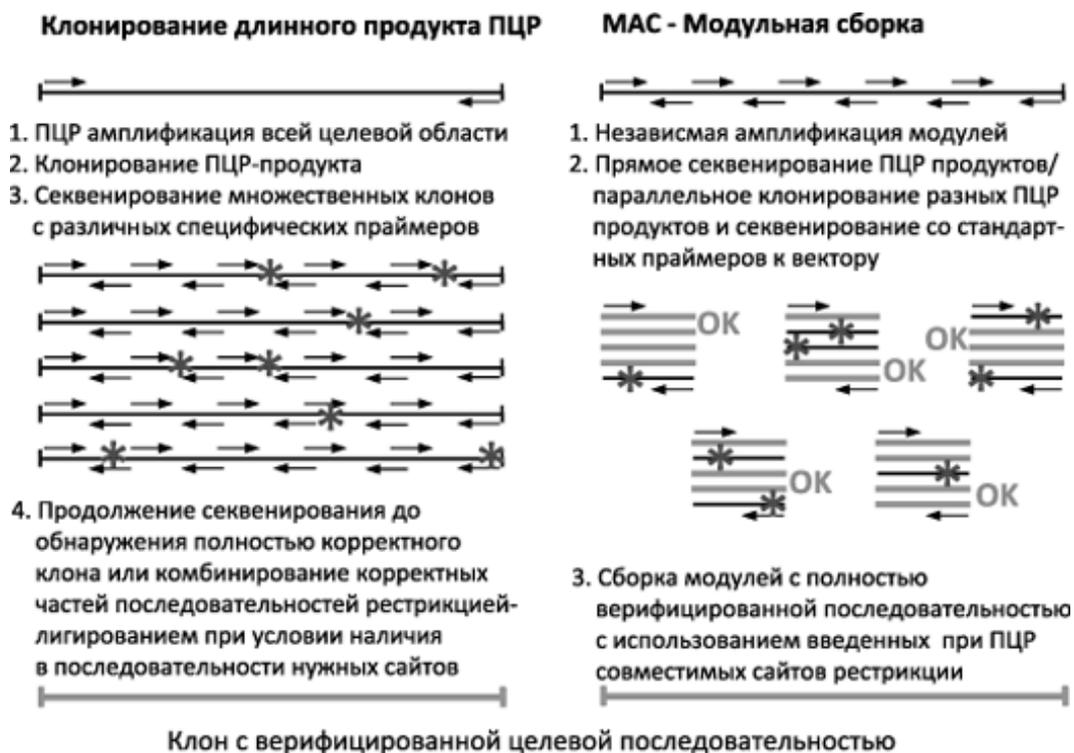


Рисунок 14. Схема принципа метода модульной сборки. Мутации или неизвестные нуклеотиды обозначены звездочками, «ОК» - верифицированные последовательности ДНК. Праймеры для секвенирования обозначены стрелками.

Все 11 модулей были получены при ПЦР с геномной ДНК CHO DG-44 без оптимизации условий, клонированы в Т-вектор, и собраны в ходе последовательных шагов рестрикции-лигирования.

Когда были опубликованы первые данные «черновой» сборки генома CHO (Hammond, Karlgarevic et al. 2011), в них были обнаружены те же отличия от AY188393, что и у нас, за исключением двух замен. Следует отметить, что фрагменты сборки генома CHO, примыкающие к гену *EEF1A1* - AFTD01093962 и AFTD01093963.1, не полностью перекрываются с последовательностью AY188393, то есть в опубликованной сборке отсутствует фрагмент длиной 810 п.о., соответствующий нуклеотидам 11387 -12196 AY188393 (Рис. 15). Полученная нами последовательность, предположительно, лучше отражает истинную последовательность этих районов, так как была достигнута большая избыточность при секвенировании клонов, содержащих короткие субфрагменты. Одна однонуклеотидная замена и инсерция двух нуклеотидов, не совпадающие со сборкой генома CHO и AY188393, встречались во всех проанализированных клонах, и могут быть обусловлены ошибками ПЦР или мутациями генома сублинии CHO DG-44.

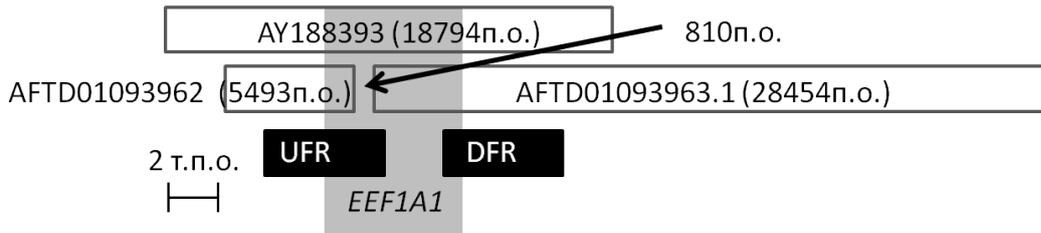


Рисунок 15. Известные данные о геномной последовательности областей, фланкирующих ген *EEF1A1* китайского хомячка. Схематически изображены имеющиеся на данный момент в данные о последовательности областей генома, окружающие ген *EEF1A1*. UFR и DFR – upstream, downstream flanking regions – районы, фланкирующие ген *EEF1A1*, использованные при создании вектора p1.1.

4.3.3. Получение экспрессионного вектора p1.1

Экспрессионный вектор p1.1 (рис. 16) был собран на основе разработанного нами нетранскрибируемого вектора pBL-2, в который были последовательно добавлены собранные из модулей геномные области, фланкирующие ген *EEF1A1* CHO, фрагмент конкатемера терминальных повторов EBV, EMCV IRES и OPC DHFR мыши.

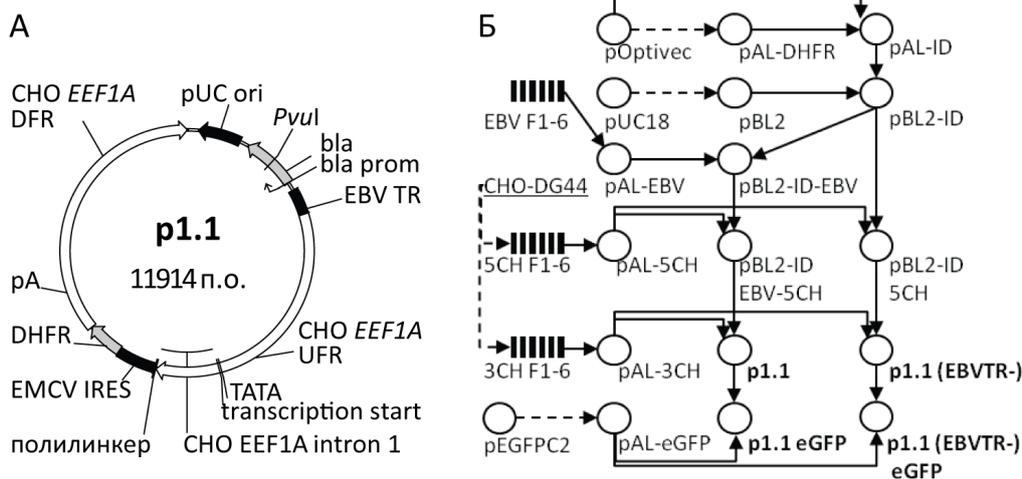


Рисунок 16. Карта экспрессионного вектора p1.1 и общая схема клонирования

А. pUC ori – область начала репликации; bla – OPC β-лактамазы, bla prom – промотор гена β-лактамазы; EBVTR – участок терминального повтора EBV; EMCV IRES – внутренний сайт связывания рибосом EMCV; DHFR – OPC дигидрофолатредуктазы мыши для селективного отбора и амплификации в эукариотических клетках; CHO *EEF1A1* UFR и DFR – районы, фланкирующие ген *EEF1A1* CHO, pA – сигнал полиаденилирования гена *EEF1A1* CHO; TATA, transcription start – TATA-бокс и точка начала транскрипции; CHO *EEF1A1* intron 1 – первый интрон гена *EEF1A1* CHO. Стрелками указаны направления транскрипции генов. Б. Прямоугольники – линейные фрагменты ДНК, круги – плазмиды. Стадии ПЦР показаны пунктирной линией, рестрикции-лигирования – сплошной.

Был также создан контрольный вектор p1.1 (EBVTR-) без повторов EBV. На основе этих векторов получены экспрессионные конструкции p1.1-eGFP и p1.1(EBVTR-)-eGFP с геном зеленого флуоресцентного белка для проверки их функциональных свойств.

4.3.4. Проверка свойств вектора p1.1 для модельного белка eGFP

Клетки CHO DG-44 трансфицировали сверхскрученными плазмидами и через 48 часов определяли интенсивность флуоресценции eGFP в лизате клеток и долю флуоресцирующих клеток. Установлено, что доля транзientно трансфицированных клеток и общий уровень продукции eGFP не различались для случаев трансфекции клеток CHO DG-44 плазмидами сходной длины, содержащими или не содержащими участок EBVTR. Эффективность транзientной трансфекции для плазмид на основе вектора p1.1 была значительно ниже, чем для контрольной плазмиды pEGFP-N2 с минимальным вирусным промотором, что объясняется большей длиной вектора p1.1.

Линеаризованные плазмиды p1.1-EGFP и p1.1(EBVTR-)-EGFP использовали для трансфекции клеток и последующей селекции стабильно трансфицированной популяции.

Культура, трансфицированная плазмидой p1.1-EGFP, содержащей участок EBVTR, проходила минимум клеточной плотности на 11-й день культивации в селективной среде, при этом плотность составила 147,5 тыс. клеток/мл при доле жизнеспособных клеток 27,7%. В случае плазмиды p1.1(EBVTR-)-EGFP, без EBVTR, минимум был достигнут на 13-ый день культивации в селективной среде, при этом плотность составила 42,5 тыс. клеток/мл при доле жизнеспособных клеток 3,6%. Средний уровень экспрессии целевого гена eGFP для обеих полученных популяций не имел существенных различий – 62,0 тыс. ОЕФ/50 тыс. клеток и 63,8 тыс. ОЕФ/50 тыс. клеток, соответственно. Таким образом, участок EBVTR не влияет на средний уровень экспрессии трансгена для стабильно трансфицированных линий клеток.

Для количественной оценки уровня интеграции плазмид в геном продуцентов через 48 ч после трансфекции клетки перемещали в селекционную среду и высевали в лунки микропланшетов по 5 тыс. клеток на лунку. Через 2 недели после посева подсчитывали общее число выросших колоний, число флуоресцирующих колоний и уровень флуоресценции для нескольких колоний с максимальной интенсивностью флуоресценции (таб. 17). При высевании в лунки планшетов клеток, обработанных трансфекционным реагентом без добавления плазмид, колониеобразования не происходило.

Таблица 17. Эффективность колониеобразования при стабильной трансфекции клеток СНО плазмидами с участком EBVTR и без него

Название плазмиды	pEGFP-N2	p1.1-EGFP	p1.1(EBVTR-)-EGFP
Транзиентно трансфицированные клетки, %	22,8%	5,8%	6,0%
Удельная интенсивность флуоресценции, тыс. ОЕФ/50 тыс. клт	114	35,3	31,9
Жизнеспособные клетки, %	86%	83%	84%

При получении олигоклональных линий-продуцентов eGFP трансфекция плазмидой, содержащей участок EBVTR, позволила увеличить количество позитивных колоний в 40 раз, при этом уровень экспрессии целевого гена для самой продуктивной олигоклональной линии был выше в 4,6 раза. При получении олигоклональных популяций стабильно трансфицированных плазмидой p1.1-EGFP клеток в присутствии 50 нМ MTX было установлено, что удельный уровень флуоресценции для 10 наиболее продуктивных олигоклональных популяций приблизительно в два раза выше, чем в случае селекции олигоклонов в среде без MTX (Рис. 17). Для получения более продуктивных линий, экспрессирующих ген eGFP, проводили амплификацию целевого гена в геноме клеток под действием MTX. Популяции клеток, стабильно трансфицированные плазмидами p1.1-EGFP и p1.1(EBVTR-)-EGFP высевали в лунки микропланшетов в присутствии различных концентраций MTX. В случае плазмиды p1.1(EBVTR-)-EGFP не наблюдали значимого увеличения уровня флуоресценции при использовании MTX в концентрациях до 200 нМ, также не наблюдали образования колоний при концентрациях MTX 400 и 800 нМ (данные не приводятся). Для олигоклональной линии, полученной при трансфекции клеток плазмидой p1.1-EGFP, были получены колонии для всех концентраций MTX, результаты измерения удельной интенсивности флуоресценции лизатов клеток для 8 колоний с максимальным уровнем экспрессии eGFP (для каждого уровня MTX) приведены на (рис. 17Б).

Таким образом, наличие участка EBVTR в плазмиде p1.1 существенно увеличивает скорость амплификации целевого гена и позволяет получать высокопродуктивные линии в короткие сроки (15 дней) под действием высоких концентраций MTX. Возможный механизм действия участка EBVTR при амплификации целевого гена – образование шпильки на одноцепочечной ДНК при транспозиции области целевого гена, ускорение амплификации трансонов по механизму транспозиции описано в работе [285]. Вероятно образование шпильки между участками GGGGGCCGCGGG (нуклеотиды 161-172) и CCCGCAGCCCC (84-95) или CCCGCGGACCCC (100-111), образующими инвертированные повторы с одной некомплемментарной парой нуклеотидов.

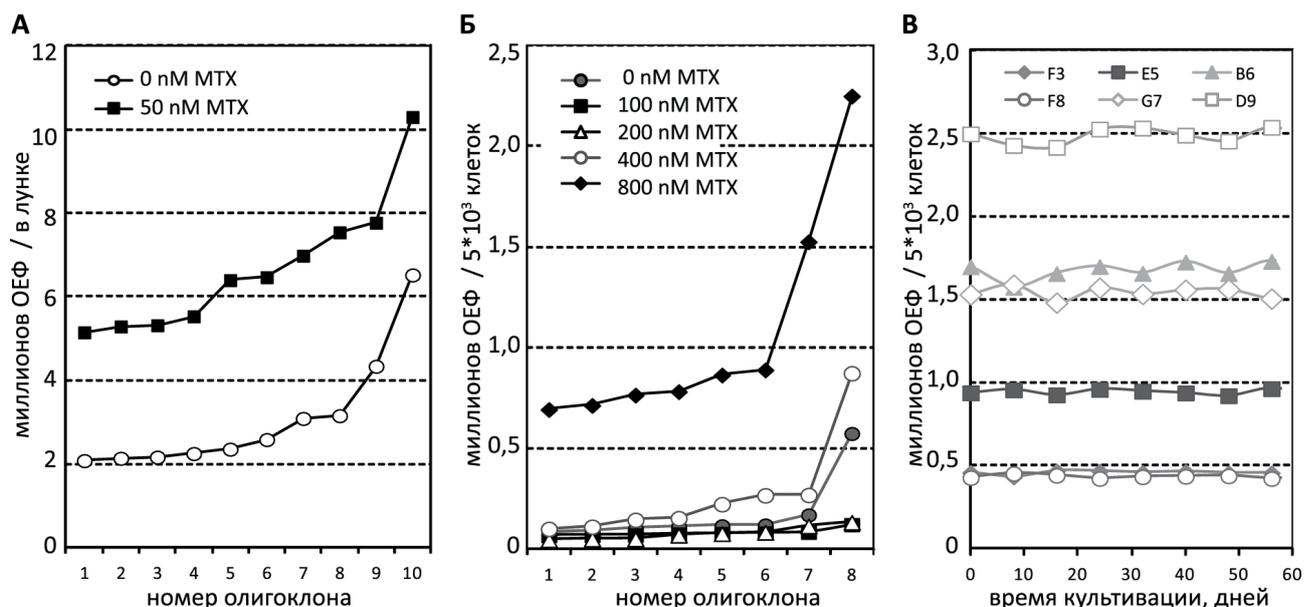


Рисунок 17. Удельная интенсивность флуоресценции для наиболее продуктивных олигоклональных линий, экспрессирующих eGFP.

А Уровень экспрессии eGFP для 10 наиболее продуктивных олигоклональных лунок, при культивации в среде, содержащей 0 и 50 нМ МТХ; Б. Уровень экспрессии eGFP для 8 наиболее продуктивных олигоклонов, полученных при амплификации трансгена под действием различных концентраций МТХ; исходная олигоклональная популяция получена без МТХ. Для всех серий панели Б – 1 шаг амплификации трансгена под действием МТХ, для каждого уровня МТХ анализировали по 2x96 лунок. В. Постоянство экспрессии eGFP линиями-продуцентами при суспензионном культивировании (пассирование 1 раз в 4 дня). ОЕФ – относительные единицы флуоресценции.

Показано, что продуктивность нескольких наилучших олигоклональных линий может быть увеличена приблизительно в 5 раз при выполнении однократной процедуры амплификации.

Для 10 олигоклональных линий были получены моноклональные линии-продуценты eGFP, из них для 6 линий с различными уровнями продуктивности измеряли динамику удельной флуоресценции при продолжительном культивировании. Значимого изменения уровня продуктивности не наблюдалось ни в одной из линий (Рис 17В), что позволяет заключить, что линии-продуценты, полученные при трансфекции клеток CHO DG-44 плазмидой на основе вектора p1.1 и последующей одностадийной амплификации целевого гена, сохраняют стабильный уровень экспрессии целевого гена в течение 60 дней. Такой срок сохранения неизменного уровня продукции целевого белка обычно считается достаточным для промышленного использования линий-продуцентов в биофармацевтике.

Амплификация целевого гена в геноме клеток-продуцентов также была оттестирована для поликлональной популяции клеток CHO DG-44, полученных при трансфекции плазмидой p1.1-eGFP и прошедших первичную селекцию в присутствии 50 нМ МТХ. Последовательное добавление к данной культуре клеток МТХ от 100 нМ до 400 нМ не

приводило к детектируемому изменению содержания eGFP или падению жизнеспособности. Дальнейшее увеличение селекционного давления провели путем параллельного культивирования клеток в присутствии 0,8 – 6,4 мкМ МТХ (Рис. 18), что привело к концентрационно-зависимому повышению доли eGFP и одновременному увеличению копийности целевого гена в геноме клеток. Таким образом, было установлено, что векторная плазмида p1.1 пригодна для проведения одностадийной амплификации под действием МТХ при различных уровнях селекционного давления.

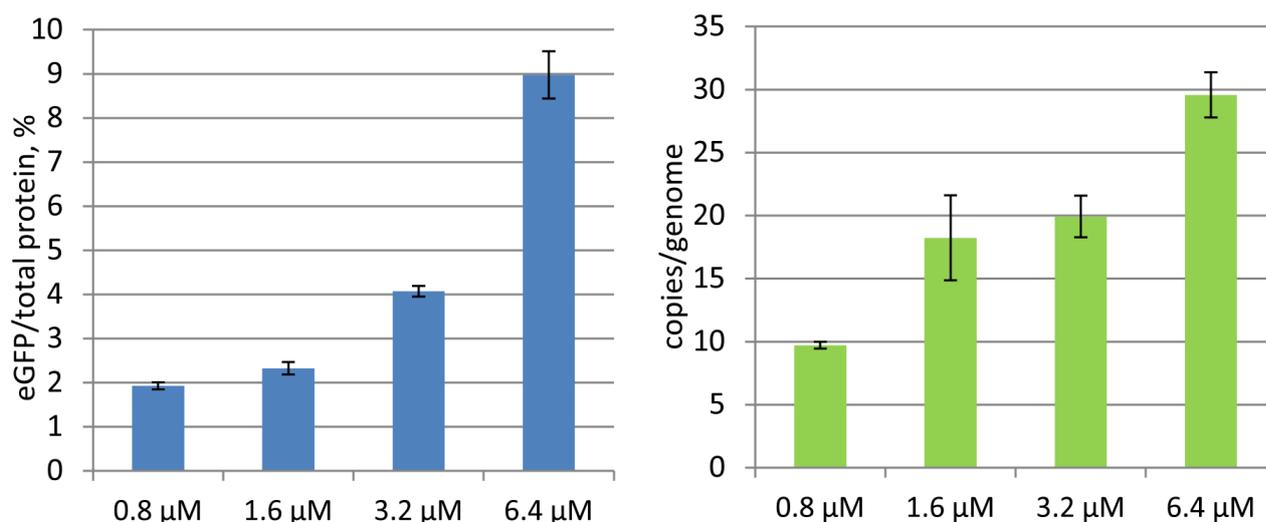


Рисунок 18. Изменение содержания eGFP при одностадийной амплификации поиклональной популяции клеток. Здесь и далее планки погрешностей приведены как стандартное отклонение, n=2 для измерения содержания eGFP, n=3 для измерения копийности генов методом количественного ПЦР.

4.3.5. Получение совместимых с p1.1 экспрессионных векторов серии p1.2

Векторы для ко-экспрессии вспомогательных генов были получены для трех наиболее широко используемых антибиотиков – G418 (производное неомицина), зеоцина и гигромицина В. Плазмиды p1.2-Neo, p1.2-Zeo и p1.2-Hyg (Рис. 19) имеют минимальные отличия от родительской плазмиды p1.1 – область IRES и DHFR была удалена, а гены устойчивости к действию соответствующих антибиотиков под контролем промотора SV 40 и снабженных терминатором транскрипции SV40 внесены вне областей ДНК, фланкирующих ген EEF1A1.

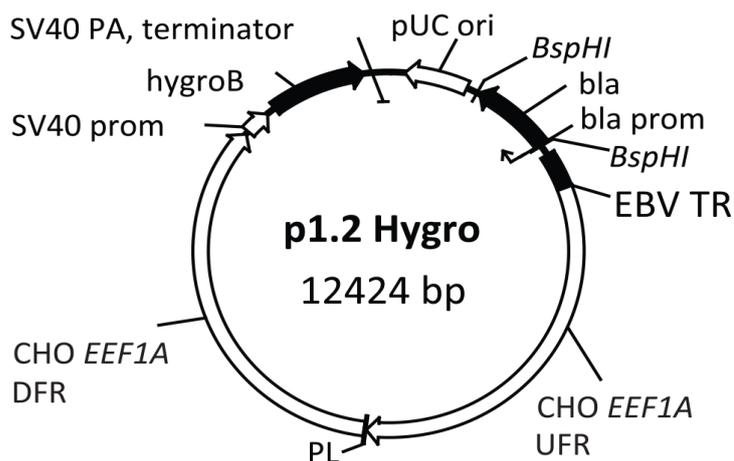


Рисунок 19. Карта плазмиды p1.2-Hygro. Обозначения: UFR – апстрим область, фланкирующая ген EEF1A1, DFR – даунстрим область, фланкирующая ген EEF1A1, PL – полилинкер; SV40 prom и SV40 PA – промотор и сигнал полиаденилирования вируса SV40. Остальные обозначения аналогично схеме плазмиды p1.1 .

При трансфекции клеток линии DG-44 производными данных плазмид, кодирующими eGFP, и последующей селекции стабильно трансфицированных популяций клеток при различных концентрациях антибиотиков было обнаружено, что результирующие популяции клеток вовсе не эквиваленты друг другу (Рис. 20) и не эквивалентны вектору p1.1, введенному в геном клеток при стандартном уровне селекционного давления.

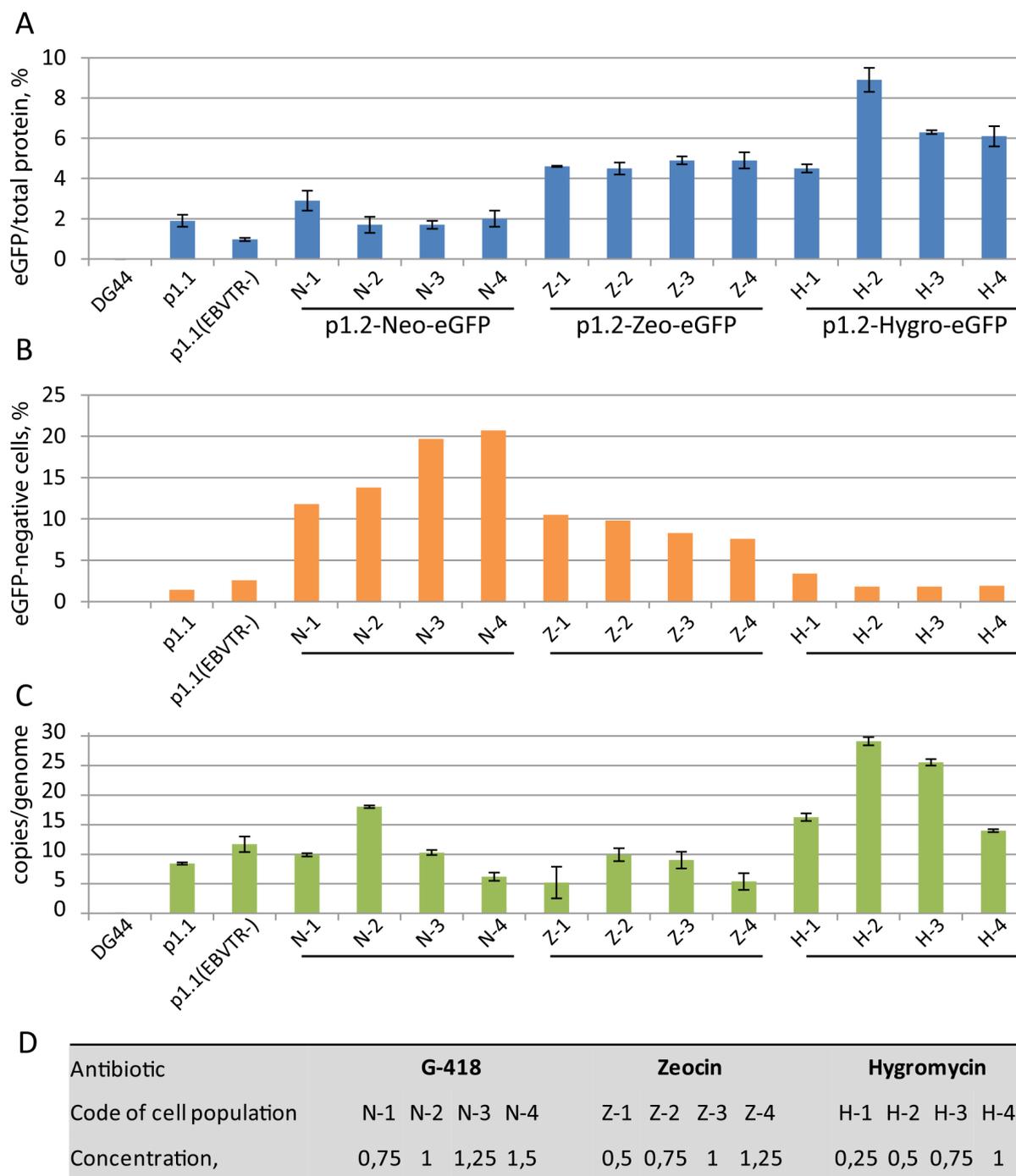


Рисунок 20. Свойства популяций клеток, стабильно трансфицированных плазмидами серии p1.2. Обозначения – DG44 – нетрансфицированные клетки линии CHO DG44; p1.1 – клетки, стабильно трансфицированные плазмидой p1.1-eGFP и полученные в присутствии 200 нМ MTX; p1.1(EBVTR-) – клетки, трансфицированные плазмидой p1.1(EBVTR-)-eGFP и полученные как указано выше. Панель А – доли eGFP среди всех внутриклеточных белков, n=2. Панель В – доли eGFP-отрицательных клеток в популяциях по данным проточной цитофлуориметрии, при селективном давлении. Панель С – число копий интегрированных в геном клеток плазмид по данным количественного ПЦР. Ампликоны расположены внутри ОРС eGFP, приведены данные одного репрезентативного эксперимента из трех, n=3-4. Обнаруженная копийность ОРС eGFP для контрольного образца DG44 менее 0,1 копии на гаплоидный геном. Панель D – коды популяций клеток и соответствующие им концентрации антибиотиков.

Для антибиотика G418, независимо от его концентрации в среде, были получены весьма гетерогенные популяции, содержащие до 20% отрицательных по флуоресценции eGFP клеток, в случае зеоцина было обнаружено, что доля отрицательных по eGFP клеток концентрационно-зависимо снижается от 10% до 7% при повышении концентрации зеоцина в среде. В случае гигромицина В доля отрицательных клеток не превышала 3%, то есть не отличалась от доли отрицательных клеток для популяции, трансфицированной плазмидой p1.1-eGFP. Общее содержание eGFP в полученных популяциях также существенно различалось – от 2% от общего белка в случае G418 до 8,9% от общего внутриклеточного белка в случае гигромицина, взятого в концентрации 0,5 мг/мл. Следует отметить, что хотя уровень eGFP для клеток, стабильно трансфицированных плазмидами серии p1.2, намного выше, чем для клеток, трансфицированных плазмидой p1.1-eGFP, этот уровень нельзя увеличить путем амплификации, в то же время для вектора p1.1 даже двухстадийная амплификация позволяет увеличить уровень eGFP до тех же 9% от общего белка, что и в случае плазмиды p1.2-Нугго-eGFP. Анализ стабильно трансфицированных клеток методом проточной цитофлуориметрии, помимо фиксации доли отрицательных по eGFP клеток, позволил выявить различное распределение eGFP- положительных клеток (Рис. 21).

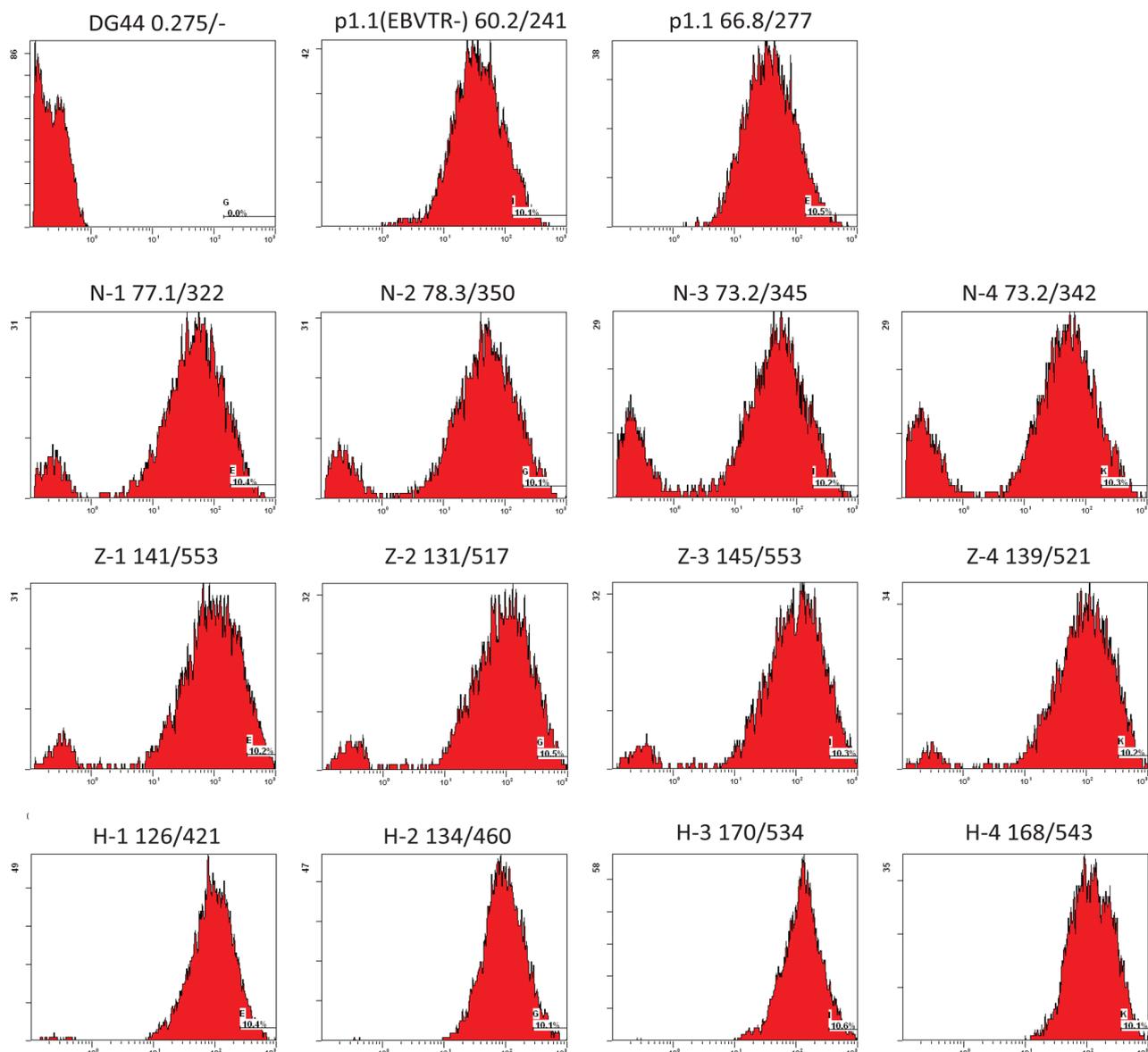


Рисунок 21. Распределение уровней экспрессии eGFP в стабильно трансфицированных клетках по данным проточной цитофлуориметрии. Коды популяций клеток приведены в предыдущем рисунке, первые числа поле кода популяции – средний уровень eGFP в образце, условные единицы, второй номер – средний уровень eGFP для 10% клеток с максимальным уровнем eGFP.

Таким образом, была создана векторная плазмида p1.1, способная интегрироваться в геном клеток линии СНО с весьма высокой вероятностью (по сравнению с контрольной плазмидой аналогичного размера), корректно отвечать на многостадийную амплификацию под действием возрастающих концентраций МТХ и не подвергаться сайленсингу или удалению из генома при продолжительном культивировании. Для данной плазмиды были получены «совместимые» производные плазмиды с другими маркерами устойчивости, для двух из них было установлено, что в популяциях стабильно трансфицированных клеток

средний уровень экспрессии гена модельного белка eGFP сравним с уровнем экспрессии этого гена для плазмиды p1.1 после 2 шагов амплификации, а доля клеток, получивших устойчивость к действию антибиотиков, но не экспрессирующих ген eGFP не превышает 5%. Такой набор плазмид потенциально позволяет получать линии клеток-продуцентов целевого белка, снабженные вспомогательными генами ферментов пост-трансляционных модификаций, либо проводить экспрессии пар и троек генов гетеромультимерных белков.

4.4. Получение и характеристика линий-продуцентов BDD-фVIII на основе разработанной системы экспрессии

Генетическая конструкция p1.1-F8BDD была получена лигированием ОРС фVIII BDD SQ и консенсусной последовательности Козак с вектором p1.1, обе НТО из кДНК фVIII были полностью удалены, и ОРС фVIII была полностью перемещена в контекст гена *EEF1A1*. Трансфекцию и получение первичной популяции клеток-продуцентов проводили в тех же условиях, что и для плазмиды pOptivec/F8BDD. Обнаружено, что уровень секреции фVIII для транзистентно трансфицированной культуры составляет 9 мМЕ/мл, а для стабильно трансфицированной популяции – 0,134 МЕ/мл по данным ИФА. Полученную популяцию использовали для проведения амплификации целевого гена в адгезионной культуре при концентрациях МТХ 50, 100, 200, 400 нМ; одновременно с этим повторно провели трансфекцию клеток CHO DG-44 плазмидой p1.1-FVIII-BDD и провели первичную селекцию продуцентов в присутствии 50 нМ МТХ в условиях адгезионной культуры. Наиболее продуктивные олигоклональные линии реадаптировали к культивации в суспензионных условиях. Результаты анализа продуцентов для различных уровней селекционного давления приведены на рис. 22.

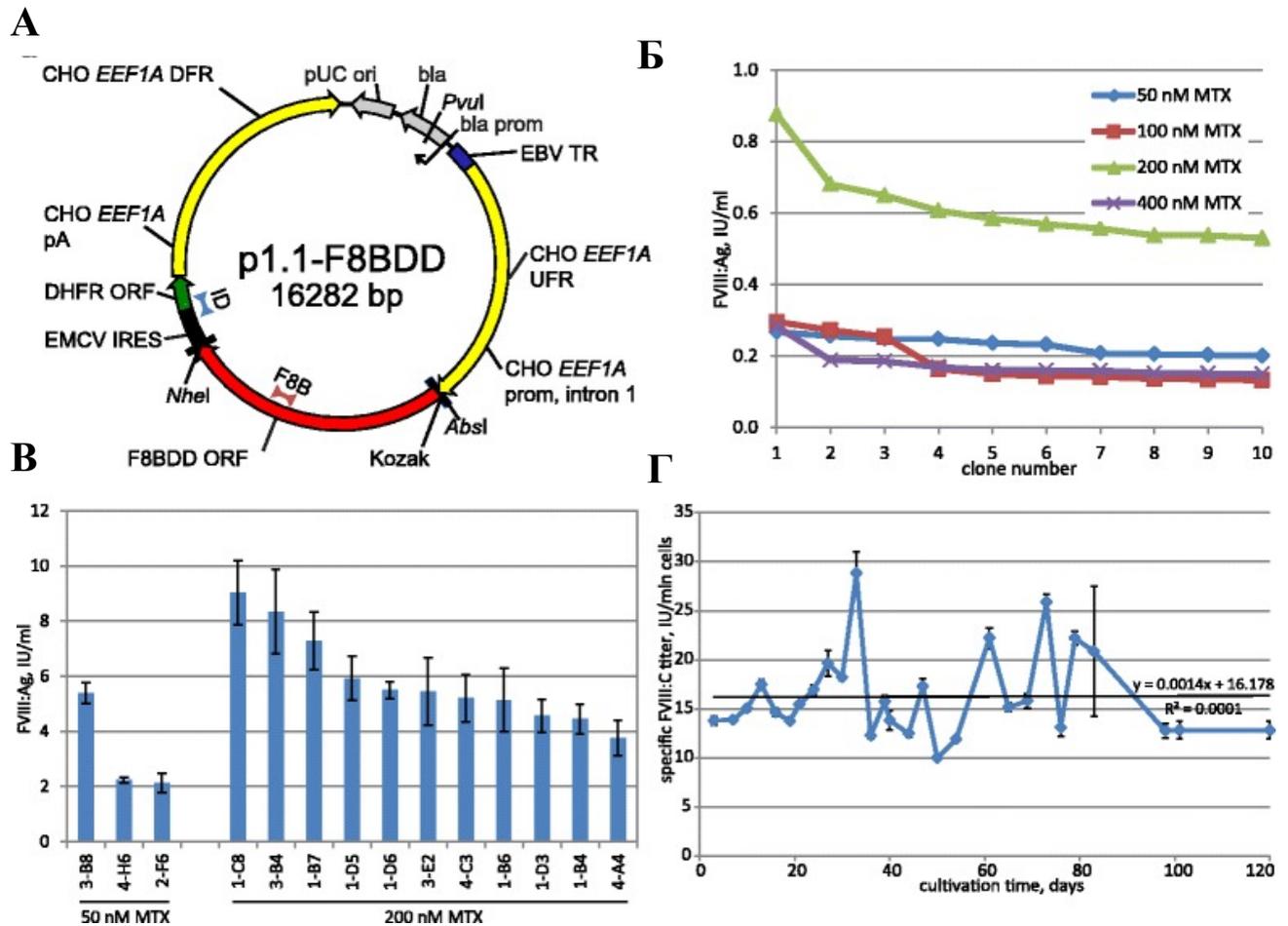


Рисунок 22. Схема экспрессионной конструкции, уровень секреции фVIII при амплификации трансгена при помощи MTX или первичной селекции в адгезионной культуре, динамика продуктивности клональной линии-продуцента при периодическом культивировании.

А – схема экспрессионной конструкции p1.1-F8BDD. Обозначения: CHO EEF1A1 UFR – апстрим область, фланкирующая ген EEF1A1, DFR – даунстрим область, фланкирующая ген EEF1A1, prom, intron 1 – промотор (точка инициации синтеза РНК) гена EEF1A1 и его первый интрон. Kozak – последовательность Козак, F8BDD ORF – область ОРС фVIII, pA – сайт полиаденилирования гена EEF1A1, ID и F8B – участки, соответствующие ампликонам ОТ-ПЦР. Серым обозначена балластная ДНК. Остальные обозначения аналогично схеме плазмиды p1.1.

Б – уровень секреции для лучших 10 олигоклональных линий, отобранных среди 182 лунок для каждой использованной концентрации MTX, измерение в момент достижения конfluence в первых 10% лунок.

В – уровень секреции фVIII для олигоклональных линий после реадaptации к суспензионному культивированию. Концентрация фVIII измерена ИФА для культуральной среды, взятой по достижении клетками концентрации 1,2 млн клт/мл.

Г – удельная продуктивность клеток линии 11A4N при периодическом культивировании, 3-4 дня между пассажами. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям, $n=2$. Линии 2-F6, 3-B8, 4-H6 получены первичной селекцией в адгезионной культуре, остальные линии получены при концентрации MTX 200 нМ.

Установлено, что одностадийная амплификация трансгена для первичной популяции клеток под действием 200 нМ MTX и первичная селекция олигоклональных линий в присутствии 50 нМ MTX приводят к получению линий со сходной продуктивностью, не уступающей продуктивности большинства описанных в литературе моноклональных линий-продуцентов делеционных вариантов фVIII. Для дальнейшей амплификации трансгена была

выбрана олигоклональная линия 3-B8, полученная первичной селекцией при концентрации МТХ 50 нМ и секретирующая только интактный фVIII по данным иммуноблоттинга (рис. 23).

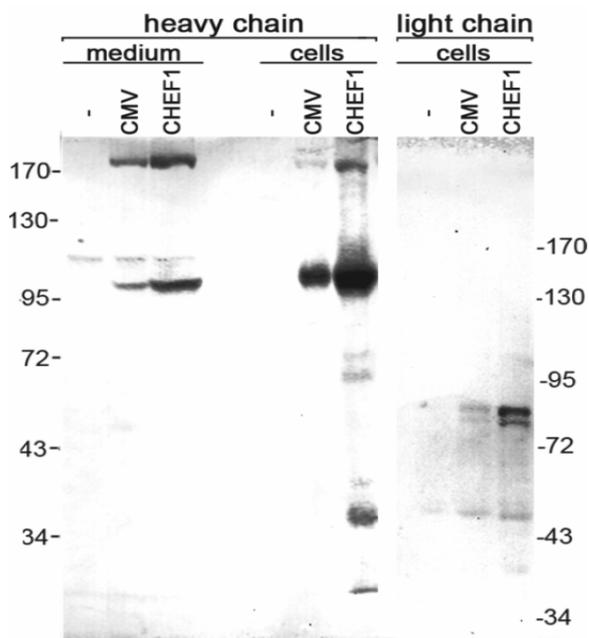


Рисунок 23. Иммуноблоттинг секретированного и внутриклеточного BDD-фVIII для различных продуцентов. «heavy chain» и «light chain» – гибридизация с моноклональными антителами к тяжелой и легкой цепи фVIII соответственно; «CMV» и «CHEF1» – образцы, соответствующие клеткам линии DG-BDDFVIII-18 (промотор CMV) и 3-B8 (промотор CHEF1), соответственно. Приведенные для каждого из антител дорожки соответствуют одной мембране, разделение в 7.5% ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях, молекулярные массы указаны в кДа.

При постепенном повышении концентрации МТХ в суспензионной культуре линии 3-B8 было обнаружено, что существенное падение жизнеспособности клеток наблюдается при концентрации МТХ 1 мкМ. Наиболее продуктивная поликлональная популяция клеток была получена при культивации в присутствии 4 мкМ МТХ (Таб. 18) и использована для генерации клональных линий-продуцентов методом конечных разведений.

Была получена 361 изолированная колония, среди которых была выбрана клональная линия-продуцент 11A4H, обладающая удельной продуктивностью 7,7 мкМЕ/клт/д по данным коагулометрии и временем деления 30 ч.

При культивировании линии 11A4H в перемешиваемой колбе в течение пяти суток в стандартной безбелковой культуральной среде ProCHO 4 был достигнут уровень фVIII:С 39 ± 3 МЕ/мл при конечной концентрации клеток 3,5 млн/мл и жизнеспособности более 85%. Для выбранной линии 11A4H постоянство уровня секреции фVIII было подтверждено для 60 дней последовательного культивирования в отсутствие МТХ.

Таблица 18. Схема получения и продуктивность основных линий и популяций продуцентов фVIII

Название линии/ популяции клеток	Схема селекции и амплификации при помощи метотрексата	Уровень секреции FVIII, МЕ/мл	Удельная продуктивность, мкМЕ/клт/д
3-B8	50 нМ	5,4±0,4*	-
3-B8 1K	50 нМ→500 нМ→1 мкМ	20,1*	-
3-B8 2K	50 нМ→500 нМ→2 мкМ	18,8*	-
3-B8 1K 2K	50 нМ→500 нМ→ 1 мкМ→2 мкМ	17,6**	-
3-B8 1K 4K	50 нМ→500 нМ→ 1 мкМ→4 мкМ	18,6**	-
13B4F	50 нМ→500 нМ→ 1 мкМ→4 мкМ→ клонирование	39,0±5,5***	6,5
11A4H	50 нМ→500 нМ→ 1 мкМ→4 мкМ→ клонирование	39,4±3,4***	7,7
21A7B	50 нМ→500 нМ→ 1 мкМ→4 мкМ→ клонирование	34,4±0,8***	6,2

* - измерение концентрации фVIII по ИФА, стандарт – полноразмерный рекомбинантный фVIII.

** - измерение активности фVIII одностадийным коагулометрическим методом.

*** - измерение активности фVIII двухстадийным коагулометрическим методом.

Методом ПЦР-РВ подтверждена амплификация экспрессионной кассеты в геноме СНО

(Рис. 24).

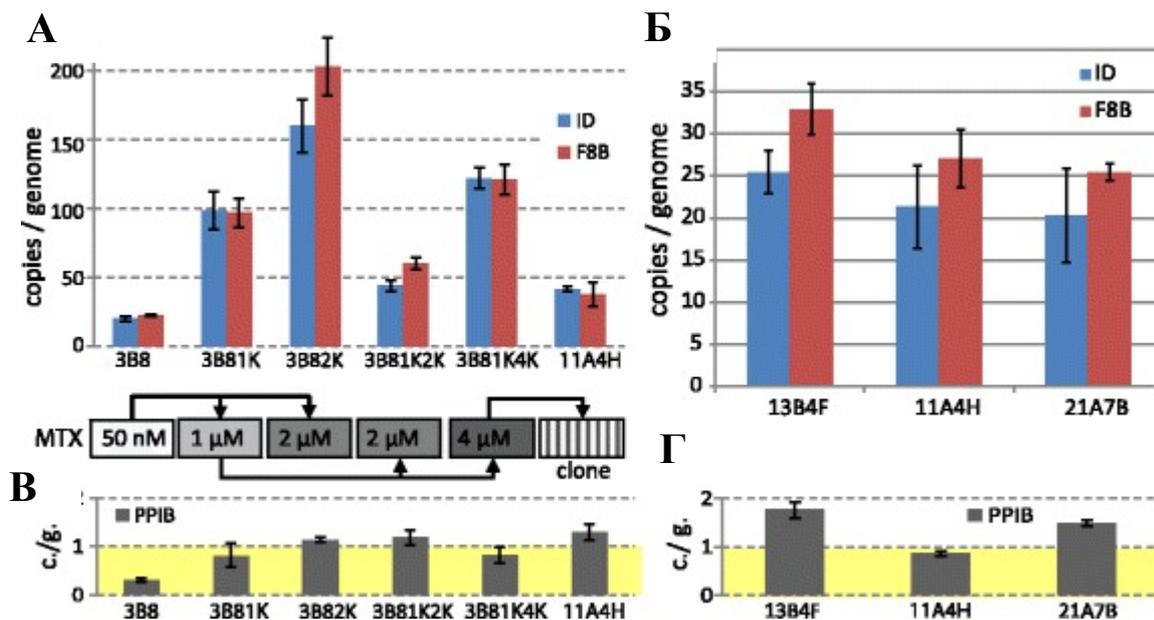


Рисунок 24. Копийность экспрессионной кассеты в геноме по данным ПЦР-РВ.

А. Изменение средней копииности экспрессионной кассеты в ходе амплификации. ID- данные, полученные при помощи праймеров к области IRES-DHFR, F8B - к области OPC SQ FVIII BDD. Приведена схема амплификации, где указаны использованные концентрации МТХ.

Б. Данные для праймеров к области гена пептидил-пролил изомеразы В (РРІВ), предположительно уникальной для генома СНО. В. Копийность кассеты для трех клонов-продуценты фVIII - 13В4F, 11А4Н, 21А7В. SPCD - удельная продуктивность клонов, мкМЕ/клт./день. Приведено число копий на гаплоидный геном СНО.

В, Г. Найденная копииность гена РРІВ в образцах геномной ДНК, соответствующей панелям А, Б. Данные представлены в виде «среднее значение ± стандартное отклонение от среднего».

Сравнение данных, полученных с использованием праймеров к области IRES и гена дигидрофолатредуктазы мыши и праймеров к OPC BDD-фVIII (области SQ делеции В-домена) показало сохранение сцепления гена селекционного маркера и целевого гена, то есть интактности экспрессионной кассеты при амплификации. Установлено, что линия-производитель 11A4H содержит 29 ± 1 копий трансгена на гаплоидный геном.

При анализе кДНК методом ПЦР-РВ не выявлено значительных различий в уровне транскрипции трансгена между тремя клонами с максимальной продуктивностью (Рис. 25А), одновременно с этим уровень секреции продукта был максимален для клона с повышенным уровнем экспрессии шаперона BiP (Рис. 25Б).

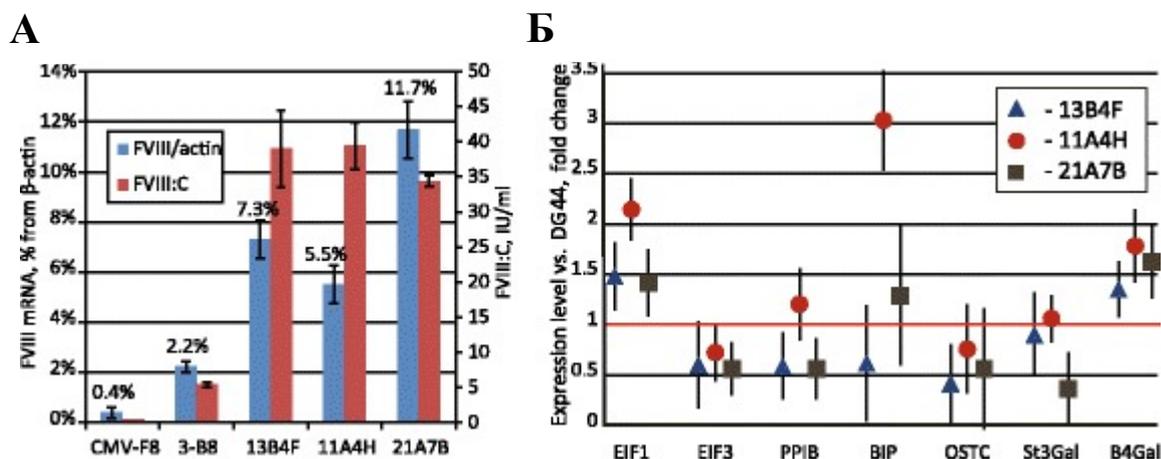


Рисунок 25. Анализ кДНК клонов-производителей фVIII методом ПЦР-РВ. А Экспрессия трансгена, % от β -актина. **Б.** Изменение уровня экспрессии генов по сравнению с DG44. Нормирование данных вели по уровню β -актина. EIF1a1- фактор инициации трансляции 1A эукариот, EIF3- фактор инициации трансляции 3 эукариот, PPIB- пептидил-пролил изомераза B (циклофилин B), BIP – иммуноглобулин-связывающий белок (Grp78); OSTC- субъединица комплекса олигосахарилтрансферазы; St3gal –бетагалактозид-2,3-сиалил трансфераза III; B4gal - β -1,4-галактозилтрансфераза I. 13B4F, 11A4H, 21A7B – клоны-производители фVIII, фIXp – контрольная популяция производителей фактора IX. Данные представлены в виде «среднее значение \pm стандартное отклонение от среднего».

Методом гибридизации по Саузерну для клонов 11A4H и 21A7B было установлено, что копии интегрированного в геном клеток-производителей экспрессионного вектора в основном присутствуют в неизменном виде (Рис. 26).

Для области OPC фVIII не обнаруживаются рестриктных фрагментов измененной длины, а для областей DHFR, EMCV IRES, bla наблюдается присутствие одного укороченного рестриктного фрагмента, что может указывать на наличие преобладающего разрыва последовательности ДНК экспрессионной конструкции в одной из этих областей, то есть предположительного нахождения преобладающей точки рекомбинации ДНК экспрессионной конструкции и геномной ДНК клетки-хозяина в одной из них.

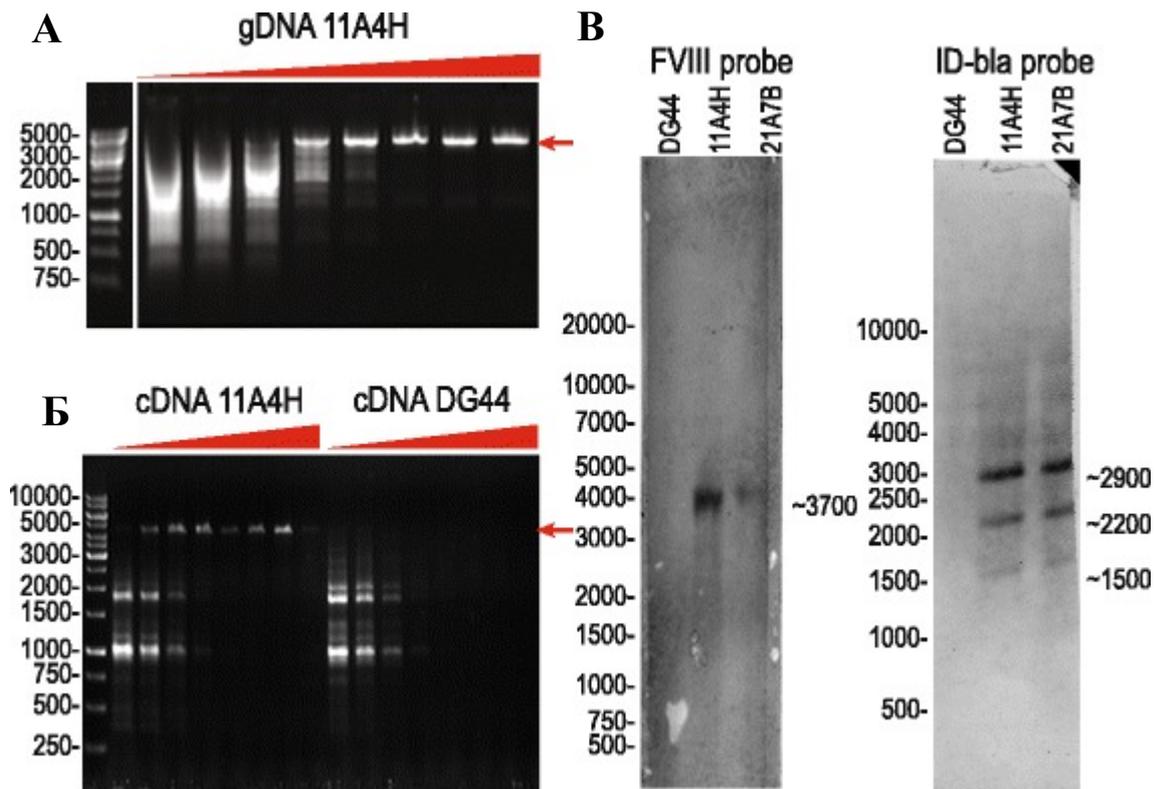


Рисунок 26. Анализ целостности области OPC фVIII для геномной ДНК и кДНК клонов – продуцентов фVIII

А - ПЦР геномной ДНК клеток линии 11A4H, градиент температуры элонгации обозначен красным треугольником.

Б - ПЦР кДНК из клеток линии 11A4H и нетрансфицированных клеток CHO DG44.

В – гибридизация по Саузерну, методами ПЦР гибридизации по Саузерну с мечеными биотином зондами. FVIII probe - гибридизация с меченым биотином зондом к области OPC фVIII, IRES-DHFR-bla – с зондом к вспомогательным областям экспрессионной кассеты (OPC DHFR, EMCV IRES, bla, рUC18 ori). Разделение в 0,8% TBE-агарозе, геномная ДНК рестрицирована *EcoRI*. Изображения ДНК в геле инвертированы, контраст сканограмм окрашенных мембран увеличен для улучшения видимости полос гибридизации. Размер полос маркера указан в п.о., ожидаемый размер корректного продукта ПЦР – 4818 п.о.

4.4.1. Изменение условий культивирования для увеличения концентрации фVIII в среде

Для многих различных рекомбинантных белков описывалось увеличение скорости их секреции клетками при добавлении бутирата натрия в культуральную среду в концентрации около 100 мкМ [286]. Такие данные были получены и для фVIII [82], предположительной причиной повышения уровня секреции фVIII является инактивация транскрипционного сайленсера в составе мРНК фVIII [80]. Сходный эффект был описан для пропионата натрия [28], одновременно с этим было показано, что добавление к культуральной среде бутирата натрия индуцирует состояние стресса в эндоплазматическом ретикулуме [275], что приводит к повреждению клеток. Основным последствием эндоплазматического стресса является

развитие окислительного стресса клеток, что может быть купировано мембрано-проницаемыми антиоксидантами, такими как ВНА.

Влияние бутирата и пропионата натрия на продуктивность клеток линии 11A4H исследовалось при продолжительности культивирования 24 ч. В случае пропионата натрия наблюдали концентрационно-зависимое падение как титра фVIII в культуральной среде, так и концентрации жизнеспособных клеток (VCD), (Рис. 27), а в случае бутирата натрия фиксировали клеточный рост для его концентраций в среде до 0,25 мМ. При низкой концентрации бутирата натрия – 62,5 мкМ, было зафиксировано повышение титра фVIII в среде на 20% по сравнению с контролем при трех днях инкубации клеток в присутствии бутирата натрия. Отношение прокоагуляционной активности секретируемого фVIII и его концентрации как антигена по ИФА оставалось неизменным при культивации в присутствии бутирата натрия в концентрациях до 0,5 мМ; таким образом, бутират натрия не влияет видимым образом на прокоагуляционную активность фVIII.

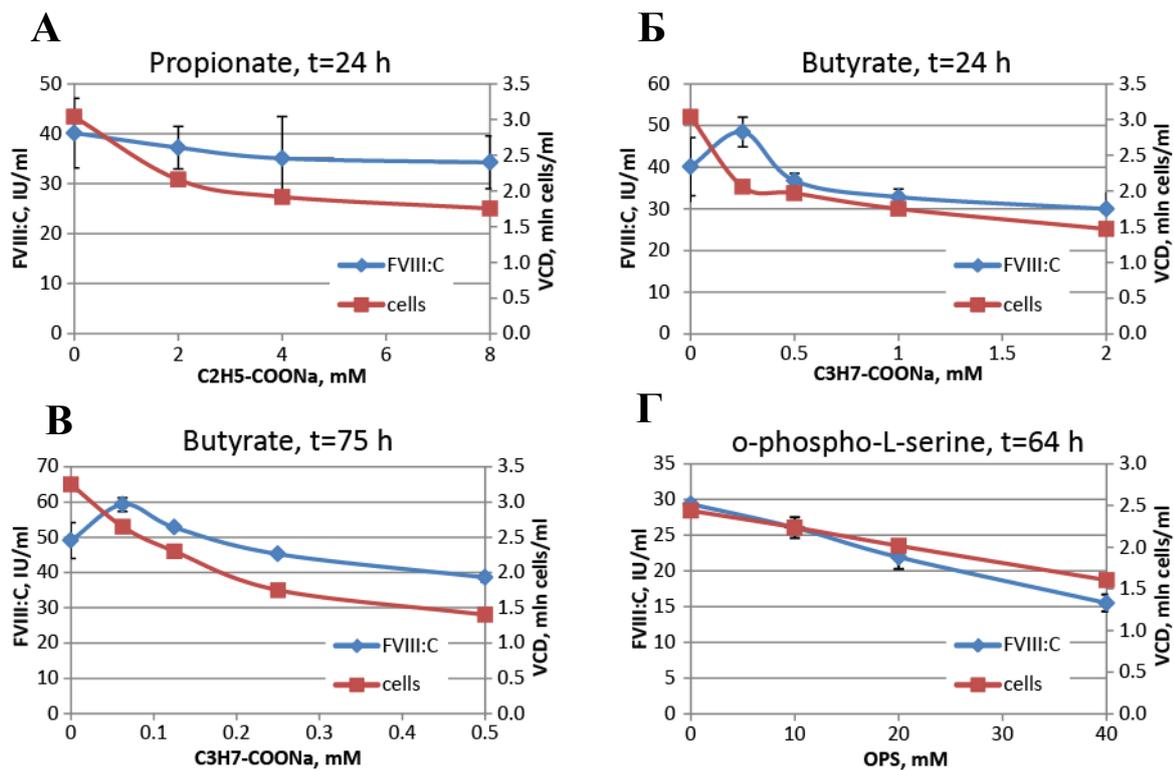


Рисунок 27. Влияние пропионата натрия, бутирата натрия и о-фосфо-L-серина на концентрации секретируемого фVIII и жизнеспособных клеток; клеточная линия 11A4H. Время роста указано над соответствующими графиками. Посевная плотность клеток на панелях А, Б, Г – 1,4 млн клеток/мл, для панели В – 375 тыс. клеток/мл. Указаны стандартные отклонения, n=2.

Измеренный уровень генерации активных форм кислорода (ROS) – типичного маркера уровня окислительного стресса клеток, также возрастал при увеличении

концентрации бутирата натрия в культуральной среде (Рис. 28). Этот эффект был полностью нивелирован добавлением к культуральной среде фетальной сыворотки до 10% или ВНА в концентрации 10 мкМ. При одновременном добавлении к культуральной среде бутирата натрия и ВНА концентрация фVIII после 96 ч культивирования возрастала практически вдвое по сравнению с контролем за счет сильного увеличения удельной продуктивности клеток. Таким образом, нами было продемонстрировано, что продуктивность линии 11A4H может быть значительно увеличена при добавлении к культуральной среде нетоксических компонентов в достаточно небольших концентрациях.

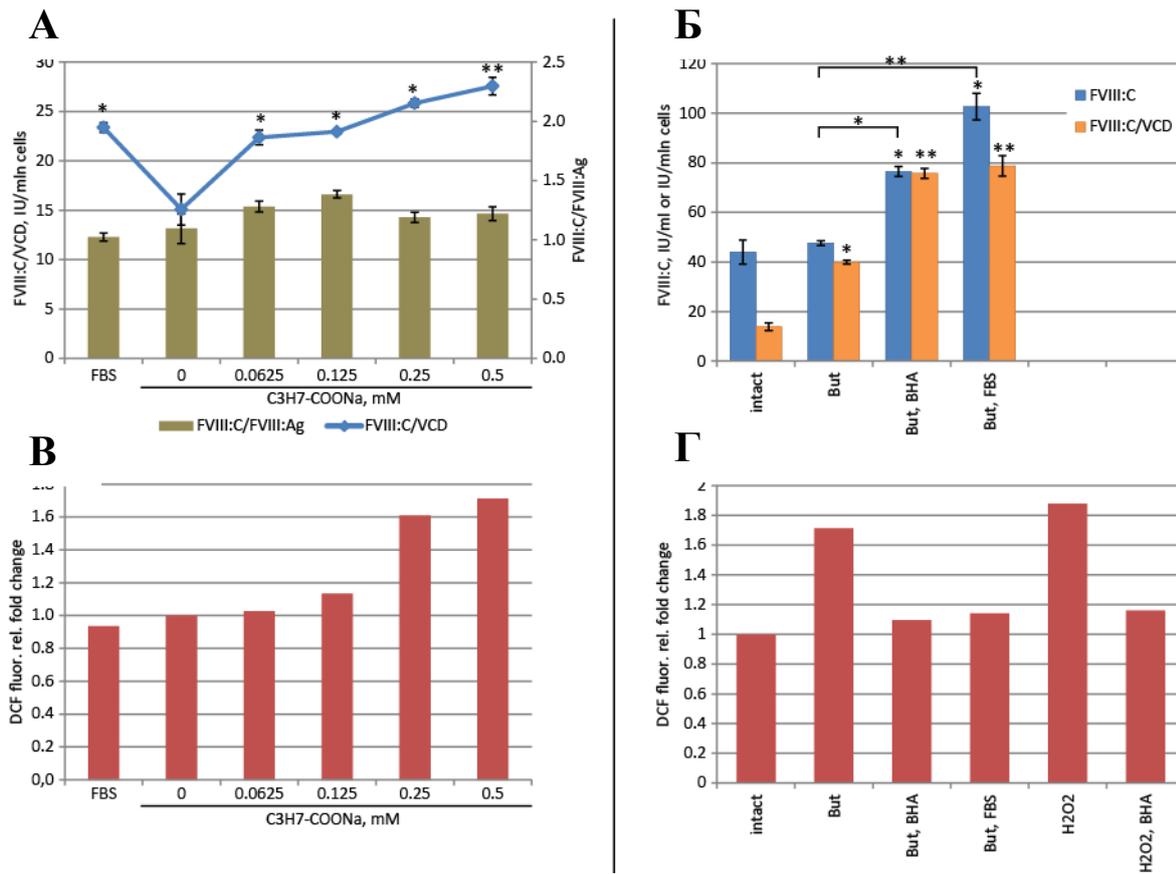


Рисунок 28. Индукция окислительного стресса в клетках линии 11 A4N при внесении в культуральную среду бутирата натрия и его предотвращение внесением ВНА. Панели А, В – культивация в присутствии бутирата натрия, 72 ч. Панели Б, Г – культивация в присутствии 0,5 мМ бутирата натрия, концентрации других агентов - 10 мкМ ВНА, 10% сыворотки (FBS), 100 мкМ H₂O₂, выращивание в течение 96 ч. Панели В, Г – цитометрический анализ клеток, окрашенных DCF, образцы клеток соответствуют культуральной среде на панелях А, Б. Данные представлены как средние ± стандартное отклонение, n=2-3. Статистическая значимость различий оценивалась по критерию Стьюдента (* - p<0.05; ** - p<0.01). Опытные образцы сравнивали с образцом «intact» или «0 мМ», если на изображении скобкой не указано иное.

Известно, что существенная часть секретируемого клетками фVIII подвергается обратному связыванию с мембраной клетки [91], этот феномен особенно выражен для кислых мембран, содержащих большие количества фосфатидилсерина. Для полноразмерного фVIII, секретируемого культивируемыми клетками млекопитающих, доля захваченного мембраной белка составляет около $\frac{3}{4}$ [32], для варианта фVIII с делецией В-домена уровень обратного захвата мембраной достигает 90% [74]. Согласно опубликованным данным, мембранно-связанный фVIII может быть переведен в растворимую форму при добавлении фактора фон Виллебранда, аннексионная V или водорастворимого аналога фосфатидилсерина – о-фосфо-L-серина [92]. Связанный с мембраной фVIII также может быть диссоциирован при добавлении к культуральной среде 20-30 мМ CaCl₂. Добавление

посторонних белков, связывающих фVIII, к культуре клеток, секретирующих фVIII, может привести к его контаминации этими белками при очистке, в то же время введение фосфосерина в культуральную среду не должно сколько-нибудь существенно повлиять на ее цену и процесс очистки белка.

При обработке клеток линии 11A4H раствором NaCl+CaCl₂ согласно протоколу из [92] высвобождалось не более 15% фVIII от уже содержащегося в культуральной среде. Добавление фетальной сыворотки, содержащей фактор фон Виллебранда быка, увеличивало титр фVIII на 60% при культивации в течение 72 ч, однако мы предполагаем, что это увеличение титра было вызвано не высвобождением фVIII, связанного с мембранами, а защитой фVIII от протеолитического распада. Добавление фосфосерина к культуральной среде не привело к видимому увеличению концентрации фVIII, одновременно с этим мы наблюдали существенное падение количества жизнеспособных клеток. Таким образом, в случае линии 11A4H не наблюдается сколько-нибудь значимого связывания фVIII с мембраной клеток-продуцентов, что может быть обусловлено низким содержанием кислых фосфолипидов в их мембране.

4.4.2 Очистка и характеристика BDD-фVIII

Выделение и очистку фVIII из культуральной среды проводили при помощи пяти последовательных стадий хроматографии, ультрафильтрацию и сходные методы разделения не использовали из-за необратимого связывания фVIII с материалом ультрафильтрационных мембран. Данные гель-электрофореза белковых фракций, полученных на трех первых стадиях очистки, приведены на Рис. 29, таблица очистки приведена в Таб. 19. Было установлено, что гомогенный по данным электрофореза препарат фVIII может быть получен при помощи стадий очистки на сорбентах Capto MMC, SP Sepharose, VIII Select, однако удельная прокоагуляционная активность, соответствующая фармакопейным требованиям для лекарственного препарата делеционного варианта фVIII «ReFacto», достигается только после проведения пяти стадий очистки. Общий выход целевого белка (по прокоагуляционной активности) составил более 20%, что позволяет считать использованный процесс выделения и очистки пригодным для промышленного использования.

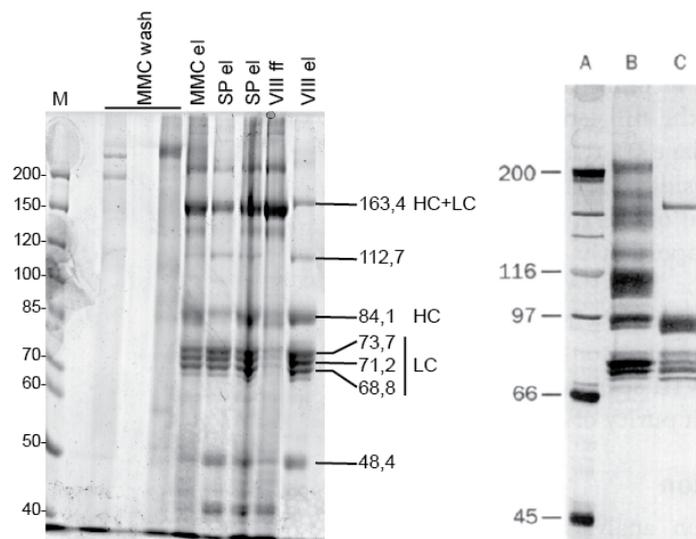


Рисунок 29. Электрофореграмма белковых фракций препарата фVIII в процессе хроматографической очистки. Обозначения: М – маркер; MMC wash – фракции промывки, стадия 1; SP el – фракции элюции, стадия 2; VIII ff – фракция проскока, стадия 3; VIII el – фракция элюции, стадия 3. HC – тяжелая цепь, LC – легкая цепь. Молекулярные массы указаны в кДа. Восстанавливающие условия, окраска коллоидным Кумасси синим. Дорожки А, В, С приведены из [48].

Таблица 19. Таблица очистки фVIII

№ стадии	Тип хроматографии	Сорбент	Объем, мл	Белок, мг/мл*	Активность, МЕ/мл**	Удельная активность, МЕ/мг	Кол-во фVIII, тыс. МЕ	Выход стадии	Выход общий
0	Культуральная среда	-	320	--	36,3	-	11,6	-	-
1	Мультимодалная катионообменная	Capto MMC	17	0,233	496,9	2133	8,45	73%	73%
2	Катионообменная	SP Sepharose	10	0,271	538,1	1986	5,38	64%	46%
3	Аффинная	VIII Select	11	0,046	382,0	8304	4,2	78%	36%
4+5	Анионообменная + гелефильтрация	Capto Q + Superdex 75	10	0,026	284,1	10925	2,84	68%	24%

Примечания: *- на стадиях 0-3 измерение по методу Брэдфорд, на стадии 4+5 УФ-спектрометрией; **.- измерение прокоагуляционной активности методом АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время).

Идентификацию триптических пептидов очищенного BDD-фVIII проводили методом масс-спектрометрии. В масс-спектрах триптических гидролизатов цепей BDD-фVIII и одноцепочечной формы белка были обнаружены пики, суммарно соответствующие пептидам, составляющим 44% общей длины BDD-фVIII. В стандартном режиме работы масс-спектрометра (positive mode) не был выявлен пик пептида, потенциально содержащего три остатка сульфотирозина, а также не выявлены пики пептидов, содержащих три полностью занятых сайта N-гликозилирования, одновременно с этим присутствовали пики пептидов, содержащих частично заполненные сайты O-гликозилирования T1651, T1652, пики пептидов, потенциально содержащих одиночные остатки сульфотирозинов и пик

пептида 37-47, содержащего частично заполненный сайт N-гликозилирования N41. Присутствие в спектрах пиков пептидов с немодифицированными остатками тирозина может быть объяснено как их неполным сульфатированием, так и фрагментацией пептидов при ионизации.

4.4.3. Компьютерное моделирование, поиск синтетического лиганда для очистки фVIII

При получении фармацевтических препаратов фVIII с помощью иммуноаффинных сорбентов у пациентов выявлены аллергические реакции на остаточный иммуноглобулин мыши [287]. Альтернативой иммунсорбентам являются сорбенты с иммобилизованными малыми молекулами [288]. Компьютерное моделирование таких лигандов было проведено в две последовательные стадии: докинга виртуальной библиотеки химических соединений Asinex против пространственных рецепторных решёток доменов C1 и C2 фVIII, и докинга виртуальной библиотеки ChemBridge против тех же пространственных рецепторных решеток. Для проверки релевантности выбранных сайтов связывания использовались известные лиганды фVIII - L3 и L4. Для поиска сайтов связывания были выбраны поверхности доменов C1 и C2 фVIII, содержащие большое количество как ионизированных, так и гидрофобных боковых цепей аминокислот (согласно анализу распределения заряда и гидрофобных областей по поверхности фVIII при помощи утилиты SiteMap), и образующие область контакта фVIII с мембраной [289, 290].

Над поверхностями потенциальных сайтов связывания были расположены границы рецепторных решёток кубической формы со стороной 34 ангстрема. Докинг лигандов L3 и L4 в рецепторные решётки предполагаемых сайтов связывания доменов C1 и C2 дал величины композитного индекса Glidescore в диапазоне -7 – -9. Докинг библиотек химических соединений производился по схеме последовательного обогащения более энергетически выгодными лигандами, связывающимися с рецепторными сайтами. Докинг библиотеки Asinex позволил отобрать 40 энергетически выгодных молекул-кандидатов, величина Glidescore для которых соответствовала диапазону Glidescore конформеров L3 и L4. Значительная часть (24) соединений с наилучшими (наиболее отрицательными) значениями Glidescore имели в составе карбоксильную группу (16 из 24 содержали 2 и более карбоксильных групп).

Поскольку проведение докинга по исходной схеме для большей по размеру виртуальной библиотеки химических соединений ChemBridge потребовало бы около 60 недель вычислений одной рабочей станции, для второго этапа докинга использовали

только соединения, пригодные для иммобилизации на подложке, а также 3 рабочие станции. После фильтрации библиотеки ChemBridge было обнаружено около 120 тыс. молекул, содержащих первичную аминогруппу или карбоксильную группу. Данные молекулы были пакетно модифицированы путем включения в их состав концевой участка соответствующей линкерной группы. Был проведён докинг полученной библиотеки в решётки докинга вершин доменов C1 и C2. Величины Glidescore для кандидатных лигандов (рис. 30) соответствовали области значений Glidescore для конформеров L3 и L4 и для выбранных на первом этапе докинга кандидатов из библиотеки Asinex.

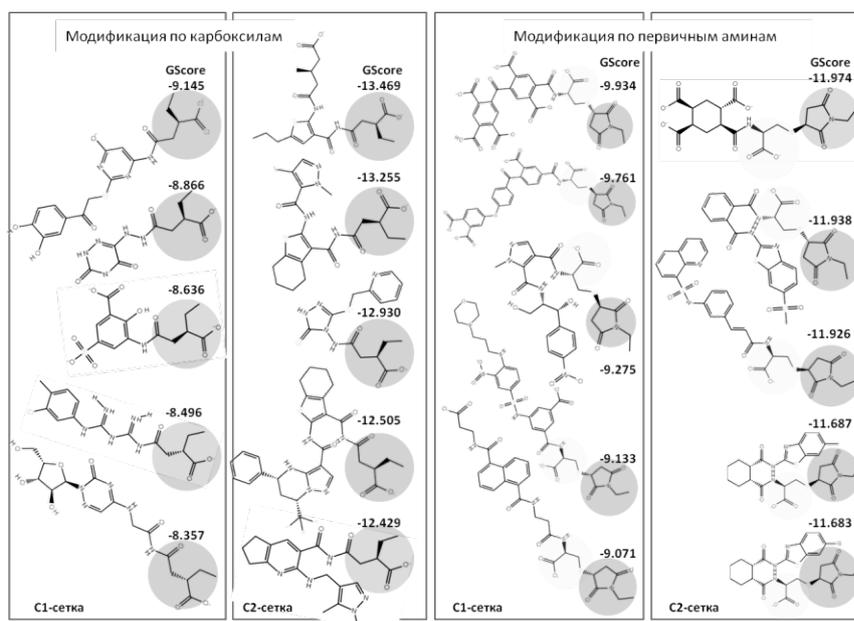


Рисунок 30. Структурные формулы модифицированных кандидатных лигандов, отобранных из библиотеки химических соединений «ChemBridge».

Таким образом, при помощи разработанного нами экспрессионного вектора p1.1 была получена клональная линия-продуцент фактора VIII свертываемости крови с исключительно высокой удельной продуктивностью и достаточной стабильностью при продолжительном культивировании, рассмотрены возможности для получения оригинального псевдоаффинного сорбента для очистки фVIII и продемонстрировано, что очищенный фактор VIII, секретируемый данной клеточной линией, может быть получен с высоким выходом. Дальнейшую проверку свойств вектора p1.1 и его производных векторов p1.2 проводили на примере фактора свертывания крови IX – типичной модельной системе экспрессии одного целевого гена и 1-2 вспомогательных генов в клетках CHO.

4.5. Ко-экспрессия гена целевого белка и вспомогательных генов на примере фактора свертывания крови IX

4.5.1. Получение и характеристика первичных линий-продуцентов фIX

Область OPC фIX с добавленной синтетической консенсусной последовательностью Козак и блоком стоп-кодонов клонировали в экспрессионный вектор p1.1 с образованием экспрессионной плазмиды p1.1-F9 (Рис. 31).

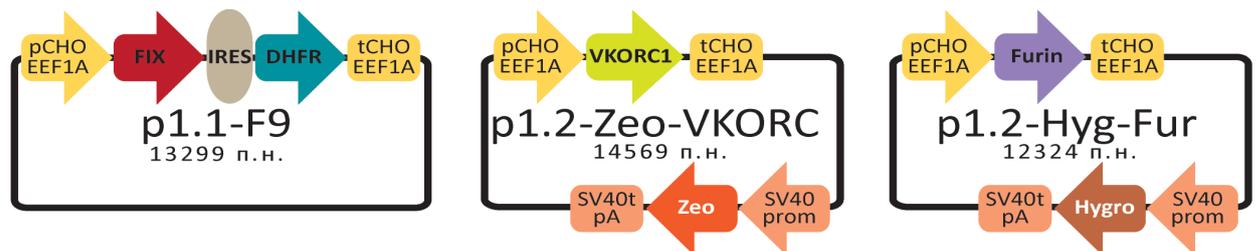


Рисунок 31. Схемы экспрессионных плазмид p1.1-F9, p1.2-Zeo-VKORC, p1.2-Hyg-Fur.; pCHO EEF1A - функциональный промотор гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, 5' нетранслируемая область этого гена и нетранскрибируемая область, фланкирующая этот ген; IRES – внутренний сайт связывания рибосом вируса энцефаломиокардита (EMCV); DHFR – OPC дигидрофолатредуктазы мыши для селективного отбора и амплификации в эукариотических клетках; tCHO EEF1A - функциональный терминатор и сигнал полиаденилирования гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, 3' нетранслируемая область этого гена и нетранскрибируемая область, фланкирующая этот ген; FIX – OPC фактора IX свёртывания крови человека; VKORC - OPC VKORC1 китайского хомячка; SV40 prom – область промотора вируса SV40; SV40t pA – терминатор и сигнал полиаденилирования вируса SV40; Zeo – OPC гена *Sh ble* (*Streptoalloteichus hindustanus bleomycin*), обеспечивающего устойчивость к зеоцину; Furin - OPC протеазы PACE/furin человека; Hygro – OPC гигромицин фосфотрансферазы. Стрелками указаны направления действия промоторов и транскрипции генов.

Плазмиду p1.1-F9 линейризовали с разрушением гена бета-лактамазы и использовали для трансфекции клеток линии CHO DG44. Транзиентно трансфицированные клетки через 48 ч после трансфекции подвергали первичной селекции в присутствии трех различных концентраций метотрексата – 50, 100, 200 нМ. Во всех трех случаях были получены стабильно трансфицированные популяции клеток с уровнями секреции фIX $0,69 \pm 0,04$ мкг/мл, $1,05 \pm 0,05$ мкг/мл и $1,83 \pm 0,24$ мкг/мл. Поскольку максимальный титр фIX был зафиксирован для культуры, полученной в присутствии 200 нМ МТХ, для этой культуры был проведен иммуноблоттинг внутриклеточного и секретированного фIX (Рис. 32), продемонстрировавший отсутствие иммунореактивных полос фIX с некорректной молекулярной массой, что косвенно свидетельствовало об отсутствии повреждений у интегрированных в геном клеток генетических кассет. Полученную поликлональную

культуру использовали для клонирования клеток методом предельных разведений. Клональные линии-продуценты фIX с максимальным титром продукта реадаптировали к суспензионным условиям культивирования в среде без нуклеотидных добавок и ингибиторов DHFR. Уровень секреции фIX для трех наилучших полученных клональных линий составил $11,9 \pm 0,4$ мкг/мл, $12,3 \pm 0,4$ мкг/мл, $9,9 \pm 0,3$ мкг/мл после 3-х дней культивации. Для дальнейшей работы была выбрана клональная линия p1.1-F9-T2/S с удельной продуктивностью (Qp) $2,99 \pm 0,06$ пг/клетка/день и временем удвоения 22,5 ч.

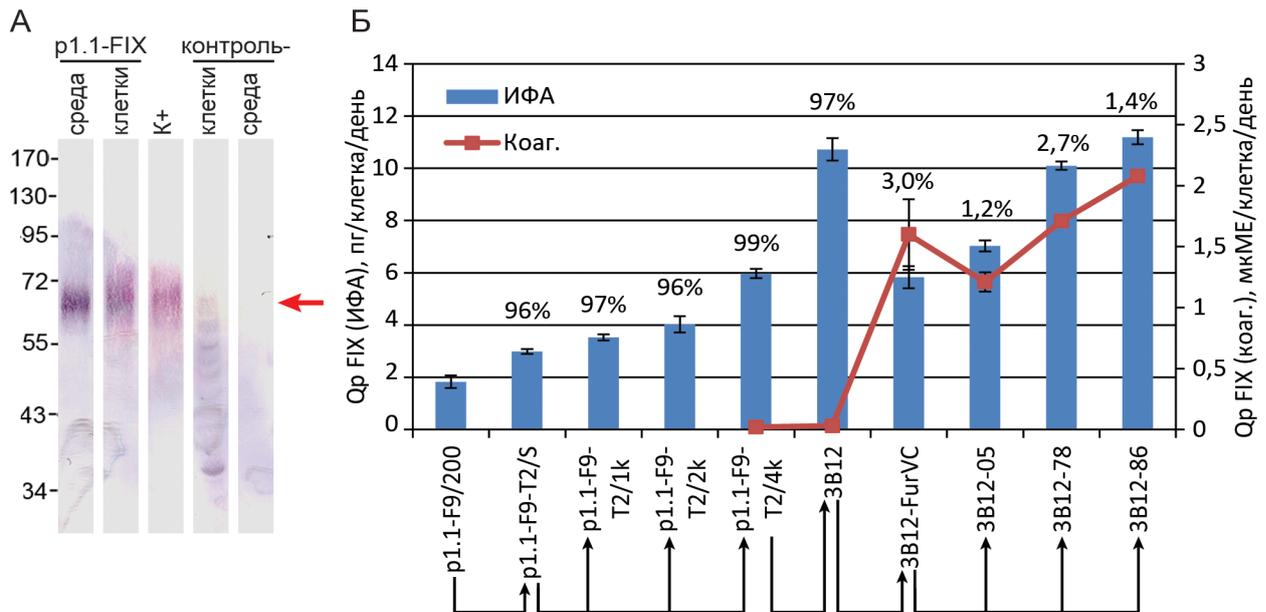


Рисунок 32. Целостность секретируемого и внутриклеточного фIX для линии клеток p1.1-F9-T2/S, уровни секреции фIX и изменение прокоагуляционной активности для линий-продуцентов, филогения VKORC1 китайского хомячка. Панель А - Иммуноблоттинг секретируемого и внутриклеточного фIX. Электрофорез в ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях, детекция поликлональными антителами к фактору IX, Молекулярная масса полос маркера указана в кДа. Обозначения: “K+” стандарт рекомбинантного фIX, “контроль-” - нетрансфицированные клетки CHO DG44. Положение полноразмерного фIX обозначено стрелкой.

Панель Б - Уровень секреции фIX и степень отделения пропептида для популяций и клональных линий. Удельная продуктивность линий клеток, измеренная по ИФА, обозначена столбиками, левая шкала. Удельная продуктивность в терминах прокоагуляционной активности приведена как ломаная линия, правая шкала. Доля молекул фIX с отделенным пропептидом, определенная по ИФА, в процентах, приведена над соответствующими столбиками. Удельная продуктивность для обоих методов приведена как среднее и стандартное отклонение, n=2. Стрелками обозначен порядок получения соответствующих линий и популяций клеток.

Продуктивность полученной клональной линии увеличивали при помощи амплификации целевого гена под действием возрастающих концентраций метотрексата. После повышения концентрации МТХ до 4 мкМ была получена олигоклональная линия

клеток с Q_p $5,97 \pm 0,18$ пг/клетка/день и использована для второго клонирования методом предельных разведений. Среди 12 полученных наиболее продуктивных клонов клеток, реадаптированных к суспензионной культивации, был отобран клон p1.1-F9-T2/4к-3B12 (далее в тексте и на рисунках – 3B12) с Q_p $10,72 \pm 0,43$ пг/клетка/день и временем удвоения культуры 20,2 ч (Рис. 32 Б).

4.5.2. Ко-экспрессия генов PACE/furin и VKORC1

Для ко-экспрессии растворимого укороченного варианта PACE/furin человека нами был применен вектор p1.2-HYG, аналогичный вектору p1.1, но содержащий расположенный вне контекста гена EEF1A ген гигромицин фосфотрансферазы под контролем промотора SV40, обеспечивающий устойчивость к антибиотику гигромицин Б (Рисунок _).

Для проведения оверэкспрессии эндогенного VKORC1 нами была клонирована OPC гена *vkorc1* из кДНК клеток CHO DG44 при помощи праймеров, гомологичных началу и концу OPC известного гена *vkorc1* мыши. Секвенирование клонированного продукта ПЦР выявило приблизительно одинаковый уровень гомологии *vkorc1* китайского хомячка с *vkorc1* мыши и человека. В последовательности VKORC1 китайского хомячка, в отличие от ортологов других млекопитающих, присутствует мотив RRR на границе первого трансмембранного домена.

Охарактеризованная область OPC гена *vkorc1* китайского хомячка была депонирована в Genbank (AFG26681.1), а также переклонирована в вектор p1.2-Zeo с образованием плазмиды p1.2-Zeo-VKORC1 (Рисунок 31 В). На основе того же экспрессионного вектора была создана также контрольная конструкция p1.2-Zeo-hVKORC1, содержащая область OPC *vkorc1* человека..

Оверэкспрессия обоих ортологов *vkorc1* в клетках CHO привела к сильному увеличению оксиредуктазной активности в лизате клеток (Таб. 20), при этом VKORC1 китайского хомячка обеспечивал втрое большую удельную ферментативную активность, чем VKORC1 человека при практически одинаковом числе копий интегрированных кассет - $5,8 \pm 0,3$ копии/геном и $5,5 \pm 0,5$ копии/геном для генов *vkorc1* китайского хомячка и человека, соответственно.

Таблица 20. Уровень активности VKORC1 для стабильно трансфицированных клеток.

Название плазмиды	-	p1.2-Zeo-VKORC1	p1.2-Zeo-hVKORC1
Удельная активность VKORC1, % конверсии субстрата на 1 мг/мл общего белка в лизате за 1 ч	0,38	9,21	3,03
Относительный уровень увеличения активности VKORC1, раз	-	24,2	8,0

Примечание: расчеты удельной активности выполнены для диапазонов линейной зависимости уровня конверсии субстрата от концентраций общего белка.

Уровень транскрипции для обоих ортологов также не имел существенных различий – уровень мРНК VKORC1 китайского хомячка составил $0,12 \pm 0,03\%$ от уровня мРНК β -актина; уровень мРНК VKORC1 человека - $0,09 \pm 0,01$; $P=0,16$. Одновременно с этим было обнаружено, что для VKORC1 человека максимальная скорость конверсии субстрата $VK > O$ составляет около 5% в час, а для VKORC1 – не менее 9% в час. Поскольку оверэкспрессия патологического гена *vkorc1* в клетках СНО позволяет достичь максимальной витамин-К оксиредуктазной активности, этот вариант *vkorc1* был использован для ко-трансфекции линии клеток-продуцентов фIX.

Клетки клональной линии 3B12 последовательно трансфицировали линейаризованными плазмидами p1.2-Zeo-VKORC и p1.2-Hygro-Fur. Для полученной популяции стабильно трансфицированных клеток, содержащих три генетические кассеты – для экспрессии фактора IX и двух вспомогательных ферментов, удельная прокоагуляционная активность фIX в культуральной среде составила 27% от стандарта, при этом доля молекул секретированного фIX с неотделенным пропептидом составляла только 3,1% по данным ИФА. Таким образом, активность растворимого PACE/furin человека в полученной популяции клеток была достаточной для практически полного отделения пропептида, однако уровень гамма-карбоксилирования в большей части клеток был недостаточен для корректного формирования Gla-домена фIX.

Для выделения клеток, в которых максимально эффективно работают оба вспомогательных фермента – то есть образуется биологически активный фIX, провели клонирование полученной популяции методом предельных разведений, используя в качестве критериев отбора перспективных клонов прокоагуляционную активность секретлируемого фIX и уровень пептидазной активности PACE/furin в культуральной среде. Пять из 12 отобранных клональных линий были успешно реадаптированы к суспензионному культивированию в присутствии водорастворимого витамина K3, для всех клонов удельная прокоагуляционная активность фIX составляла более 185 МЕ/мг. Среди этих пяти клонов

была определена основная линия 3В12-86 с Qp $11,2 \pm 0,3$ пг/клетка/день и две запасные линии – 3В12-78 и 3В12-05.

4.5.3. Характеризация линии клеток 3В12-86

Копийность гена фIX, области его селекционного маркера и вспомогательных генов в геноме линий-продуцентов и родительских популяций клеток определяли методом количественного ПЦР (Рисунок 33 А, Б). Копийность областей ОРС фIX и DHFR не имела достоверных отличий для всех исследованных объектов, то есть ни в одном из случаев не обнаружено признаков расщепления целевого гена и гена селекционного маркера, несмотря на амплификацию генетических кассет в геноме продуцентов. Копийность вспомогательных генов для всех полученных клональных линий была значительно ниже, чем копияность гена фIX, поскольку отбор клонов клеток по критерию максимальной активности гена *vkorc1* не проводили, а для PACE/furin был проведен только один раунд отбора, в котором была отобрана одна треть от всех полученных клонов клеток.

Для основной линии-продуцента 3В12-86 методом РТ-ПЦР было оценено изменение уровня экспрессии нескольких генов домашнего хозяйства, связанных с биосинтезом и пост-трансляционным процессингом белков (Рисунок 33 В). Ни для одного из проверенных генов не было обнаружено значимого изменения уровня экспрессии, что указывает на отсутствие существенного изменения системы биосинтеза и процессинга белка клеток-хозяев при секреции фIX с достигнутой продуктивностью.

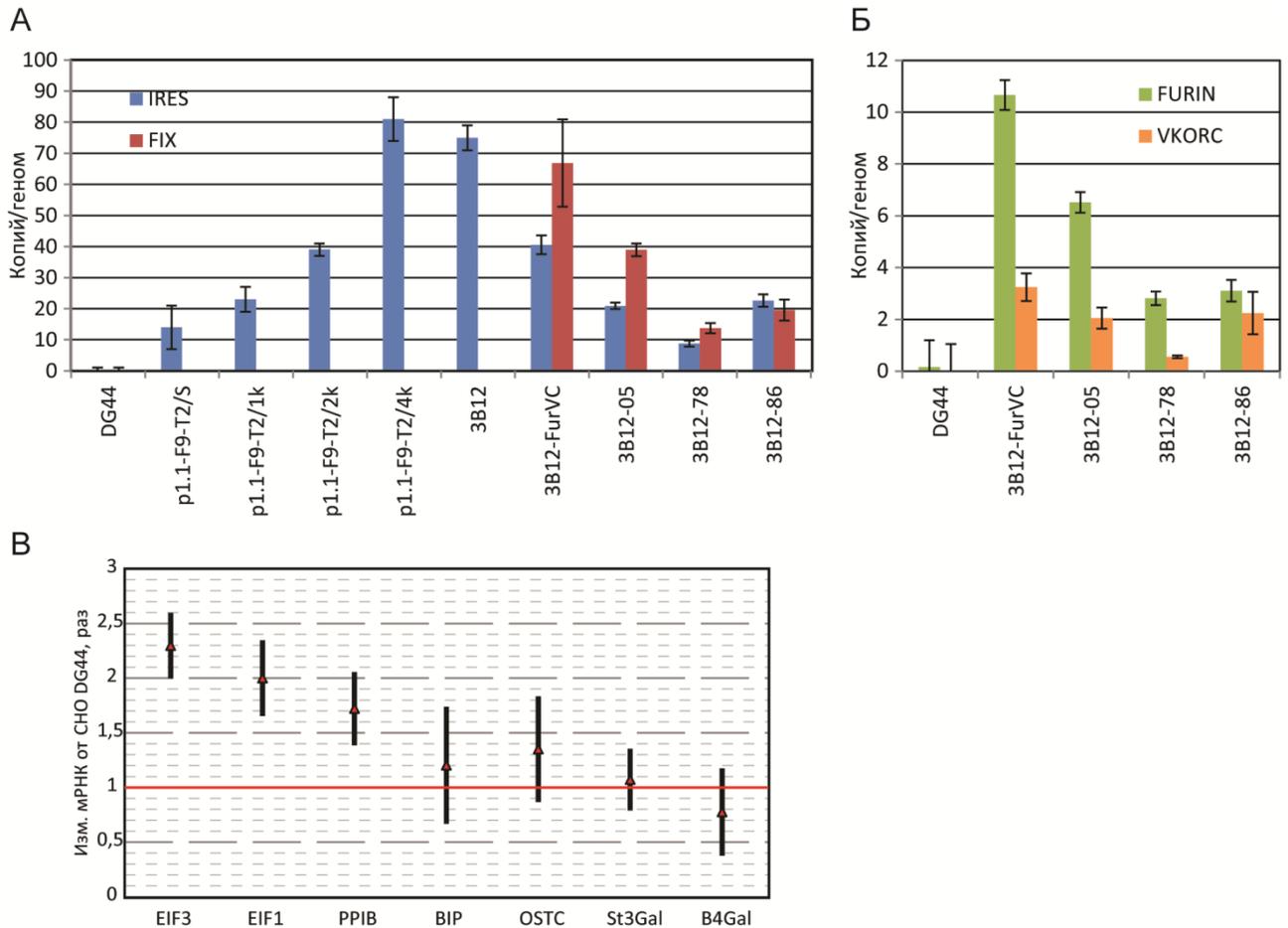


Рисунок 33. Копийность целевого гена и вспомогательных генов ферментов фурина и **VKORC1** в геноме линий-продуцентов, изменение уровня экспрессии генов домашнего хозяйства для линии клеток **3B12-86** методом количественной ПЦР. Панель А – копийность гена *FIX* и области селекционного маркера (IRES). Обозначения: IRES – ампликон из области IRES и гена *DHFR*; *FIX* – ампликон из области OPC фактора IX. Панель Б – копийность вспомогательных генов фурина и *VKORC1*. Обозначения – *FURIN* – ампликон из области OPC фурина, *VKORC1* – ампликон из области OPC *VKORC1*. Панель В - изменения в уровне экспрессии генов CHO, связанных с процессами трансляции и пост-трансляционных модификаций синтезируемых белков в сравнении с нетрансфицированными клетками CHO DG44. Нормализация результатов по уровню мРНК бета-актина. Обозначения: EIF1 - эукариотический фактор инициации трансляции 1а, EIF3 EIF1 - эукариотический фактор инициации трансляции 3, PPIB- пептидилпролил изомераза В, BIP – иммуноглобулин-связывающий белок (Grp78); OSTC – олигосахаридтрансфераза; St3gal – бета-галактозид альфа-2,3-сиалилтрансфераза 3; B4gal - бета-1,4-галактозилтрансфераза 1. Для всех панелей планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям, n=3-4, приведены данные одного репрезентативного измерения из трех.

Методом ПЦР с геномной ДНК и праймеров к областям промотора и терминатора использованных экспрессионных векторов было продемонстрировано, что преобладающие продукты ПЦР имеют корректную молекулярную массу – везде выявляется продукт размером 2942 п.о., соответствующий p1.1-F9, таким образом было подтверждено отсутствие протяженных делеций или инсерций в области OPC фIX или мутаций, приводящих к изменению сплайсинга мРНК фIX. Блоттинг по Саузерну для геномной ДНК из линии 3B12-

86 с зондом, направленным к области ОРС фІХ, выявил один рестриктный фрагмент длиной 1921 п.о. что указывает на отсутствие в геноме продуцента генетических кассет, встроившихся с разрывом ДНК в области ОРС фІХ. Псевдо-Нозерн блоттинг, проведенный для кДНК, полученных из линий 3В12-86 и 3В12-78, также выявил только мРНК фІХ ожидаемой длины.

Отсутствие мутаций в области ОРС фІХ было также подтверждено при ПЦР-амплификации всей области ОРС фІХ из геномной ДНК линии 3В12-86, клонирования ампликона и секвенирования вставки для трех плазмидных клонов. Во всех случаях не наблюдалось изменений в последовательности ОРС фІХ.

4.5.4. Выделение и очистка фІХ

Выделение и очистку фІХ из кондиционированной среды линии 3В12-86 проводили при помощи трех последовательных стадий – мультимодальной хроматографии с сорбентом *Сарто ММС*, позволяющим извлекать фІХ из кондиционированной среды без ее дополнительной подготовки; псевдо-аффинной хроматографии на анионообменном сорбенте *Сарто Q* с элюцией прокоагуляционно активных молекул фІХ хлоридом кальция при низкой ионной силе и финишной аффинной хроматографии на специализированном сорбенте *Сарто Нерагін*, отделяющем гепарин-связывающие белки от остальных молекул. Суммарный выход продукта составил 32%, удельная прокоагуляционная активность фІХ была увеличена при очистке до более чем 230 МЕ/мг, что соответствует показателям известного лекарственного препарата рекомбинантного фІХ.

Таким образом, вектор p1.1 и его производные могут быть использованы для высококопийной интеграции целевого гена и последующей интеграции небольшого числа копий вспомогательных генов без потери удельной продуктивности клеток по целевому белку. Такая задача является довольно типичной при получении в культивируемых клетках рекомбинантных белков с необычными пост-трансляционными модификациями.

Для случая фактора ІХ свертывания крови удалось получить линию-продуцент с высокой продуктивностью, секретирующей фактор ІХ с практически полной биологической активностью. Для очищенного до фармакопейных показателей фактора ІХ в условиях доклинических исследований (ФИБХ РАН) на животных было продемонстрирована безопасность созданного прототипа воспроизведенного лекарственного средства.

Примененная в данном случае схема получения линии-продуцента может использоваться и для экспрессии гетеромультимерных гликопротеинов. В частности, такой подход описывается в рекомендациях компании *Invitrogen* для получения продуцентов

рекомбинантных антител – ОРС одной из цепей антитела размещают в плазмиде с «амплифицируемым» маркером устойчивости DHFR, а вторая ОРС – в плазмиде с маркером устойчивости к неомицину или G418. Данными плазмидами в двух комбинациях ко-трансфицируют клетки CHO и ведут геномную амплификацию одной из конструкций в предположении, что для некоторых клонов клеток будет происходить событие ко-амплификации двух плазмид, встроившихся в один геномный локус. Мы предположили, что более продуктивной схемой для экспрессии пары генов цепей гетеродимерного белка могло бы стать использование трицистронной матрицы, в которой оба целевых гена и ген DHFR находятся под контролем одного промотора и соединены при помощи IRES. Данный подход был исследован на примере фолликулостимулирующего гормона человека.

4.6. Ко-экспрессия пары генов, образующих гетеродимерный гликопротеин, при помощи трицистронного вектора, на примере ФСГ

Для проведения координированной экспрессии пары генов, кодирующих субъединицы ФСГ, были получены плазмиды p1.1-FSH-A1B и p1.1-FSH-B1A, в которых области ОРС цепей ФСГ (природные последовательности, синтетическая ДНК) были соединены областью EMCV IRES дикого типа, позволяющего максимизировать уровень реинициации трансляции для второго цистрона данной мРНК (Рис. 34А), а селекционный маркер DHFR был связан со вторым цистроном через аттенюированный EMCV IRES. В результате трансфекции данных плазмид в клетки линий CHO DG-44 и CHO S (содержащей интактные аллели гена dhfr) было обнаружено, что после получения стабильно трансфицированных популяций плазмиды p1.1-FSH-B1A не дает детектируемой секреции ФСГ для обеих линий клеток, а в случае плазмиды p1.1-FSH-A1B уровень секреции ФСГ значительно выше для клеток линии CHO S, чем для CHO DG-44 (Рис 34Б), что коррелировало с относительными числами копий целевых генов в геноме продуцентов (Рис 34В). Вероятной причиной отсутствия секреции гетеродимерного ФСГ клетками, стабильно трансфицированными плазмидой p1.1-FSH-B1A, можно считать делецию части ОРС бета-цепи ФСГ при инсерции плазмиды в геном продуцентов. Это было установлено при помощи количественного ПЦР-анализа (Рис. 35).

Наиболее продуктивная популяция, полученная для клеток CHO S и плазмиды p1.1-FSH-A1B в присутствии 1 мкМ МТХ, была использована для дальнейшей геномной амплификации. По данным иммуноблоттинга, в культуральной жидкости для данной клеточной популяции проходило накопление смеси гетеродимерного ФСГ и свободной

альфа-цепи ФСГ (Рис. 34 Г,Д), что можно интерпретировать как недостаточный уровень реинициации трансляции со второго цистрона целевой мРНК.

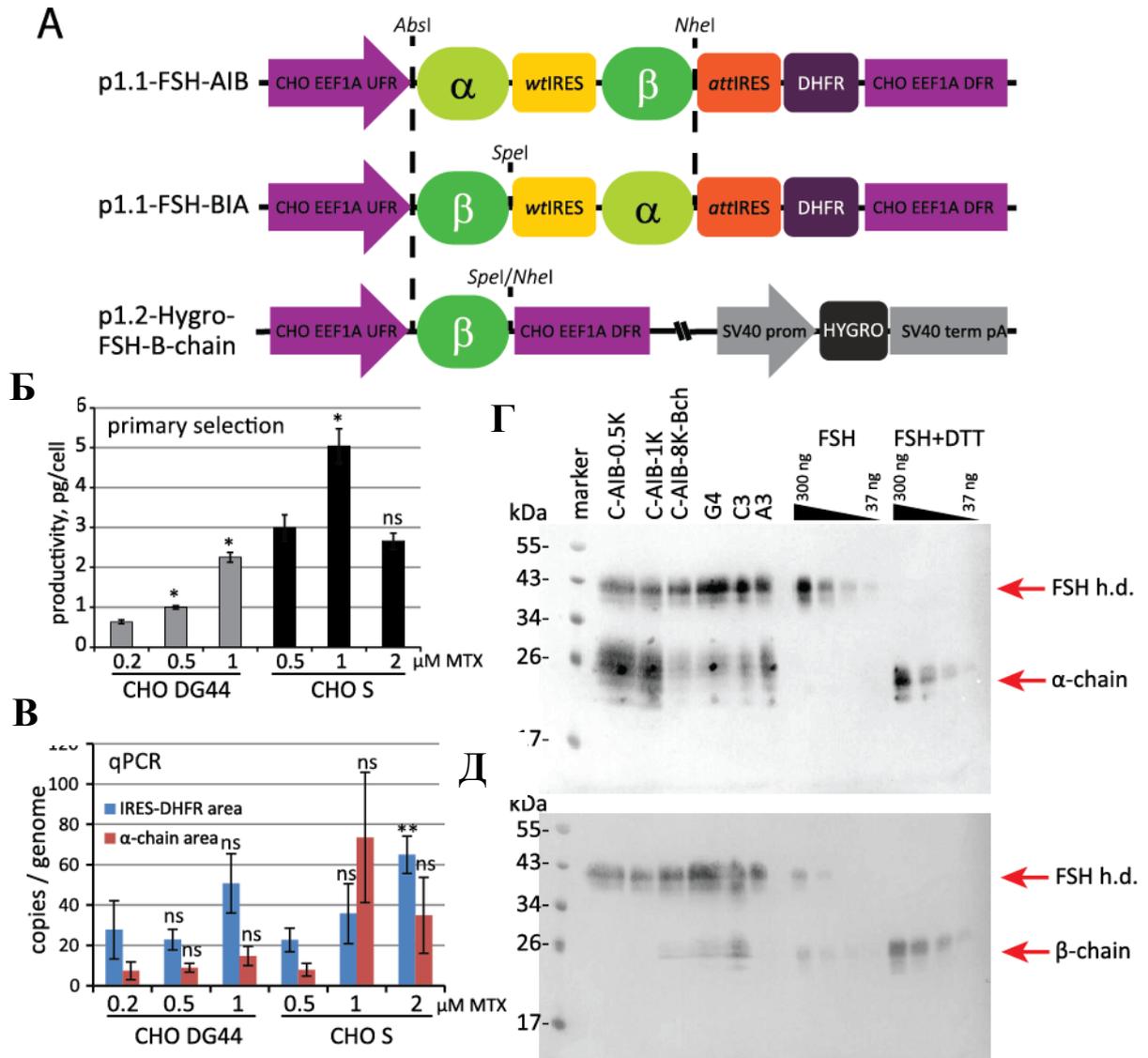


Рисунок 34. Схема генетических конструкций и характеристика первичных стабильно трансформированных клеточных популяций.

А - Схема трицистронной (p1.1-FSH-AIB, p1.1-FSH-BIA) и бицистронной (p1.2-Hygro-FSH-B-chain) экспрессионной плазмиды. CHO EEF1A1 UFR – апстрим фланкирующая область гена EEF1A1 (промотор гена альфа-фактора элонгации-1, фланкированный 5'-UTR), DFR – даунстрим фланкирующая область (терминатор альфа-гена фактора-1 элонгации и сигнал полиаденилирования, фланкированный 3'-UTR); attEMCVIRES - аттенюированный внутренний сайт связывания рибосомы вируса энцефаломиокардита; промотор SV40 - промотор полиомавируса обезьяны 40; SV40term, pA - терминатор и сигнал полиаденилирования полиомавируса обезьяны 40, Hygro B - ген устойчивости к гигромицину В (фосфотрансфераза гигромицина В). Сайты рестрикции, используемые для клонирования, выделены курсивом. **Б** - уровень секреции ФСГ в стабильно трансформированных клеточных популяциях методом ИФА. Данные средние, n = 2. **В** – ПЦР-РВ - анализ числа копий экспрессионной кассеты для гаплоидного генома. Область IRES-DHFR - пара праймеров RT-ID-F, RT-ID-R; область альфа-цепи - пара праймеров SQ-FA-F, SQ-FA-R. Все данные нормализованы к числу копий гена PPIB. Столбики ошибок представляют стандартное отклонение, n = 3. **Г** - Вестерн-блоттинг секретируемого ФСГ в средах с культурами антител к альфа-цепи. C-AIB-0.5K - стабильно трансфицированная клеточная линия CHO S 0,5 мкМ MTX, C-AIB-1K - поликлональная популяция, полученная при 1 мкМ MTX, C-AIB-8K-Bch - поликлональная популяция, амплифицированная до 8 мкМ MTX и дополнительно трансфицированная плазмидой p1.2-Hygro-FSH-B-цепи; G4 - моноклональная клеточная линия C-P1.3-FSH-G4, C3 - моноклональная клеточная линия C-P1.3-FSH-C3, A3 - моноклональная клеточная линия C-P1.3-FSH-A3;

FSH - Gonal F, FSH + DTT - Gonal F, предварительно обработанный 10 мМ DTT, «FSH h.d.» - гетеродимер FSH. SDS-PAGE в невозстанавливающих условиях, молекулярные массы приведены в кДа. Д - Вестерн-блоттинг секретируемого ФСГ, антитела к бета-цепи. Те же образцы для панели D, другая мембрана.

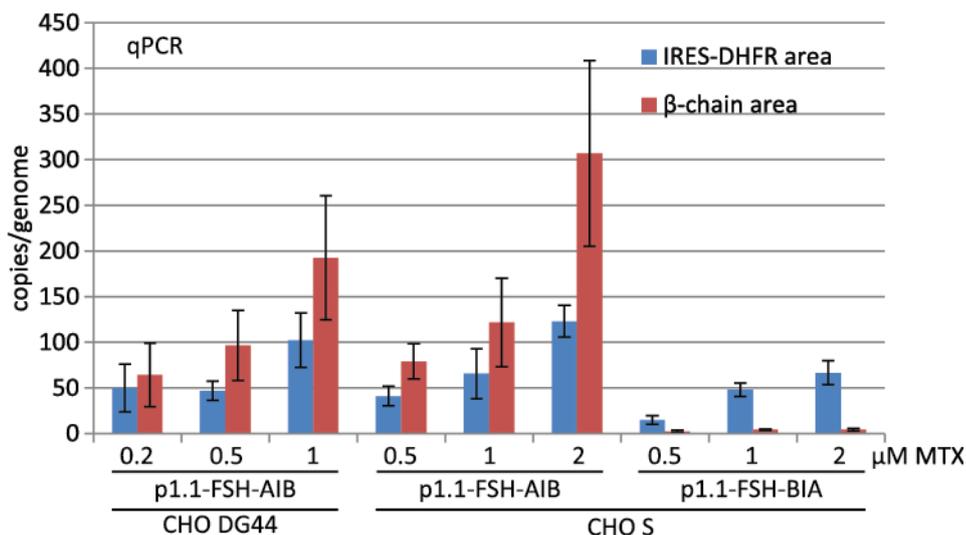


Рисунок 35. Число копий OPC бета-цепи ФСГ и области EMCV IRES в геноме стабильно трансфицированных клеток. Обозначения: IRES-DHFR area – ампликон, расположенный на краях областей EMCV IRES и OPC DHFR, β-chain area – ампликон, расположенный внутри OPC бета-цепи, праймерные олигонуклеотиды SQ-FB-F, SQ-FB-R. Данные о числе копий нормализованы на число копий гена PPIB. Указано стандартное отклонение, n=3.

После проведения многостадийной амплификации целевого гена под действием MTX уровень секреции ФСГ удвоился (Рис 35А), но отношение уровней секреции гетеродимерного гормона и альфа-цепи не изменилось (Рис 34 Г,Д).

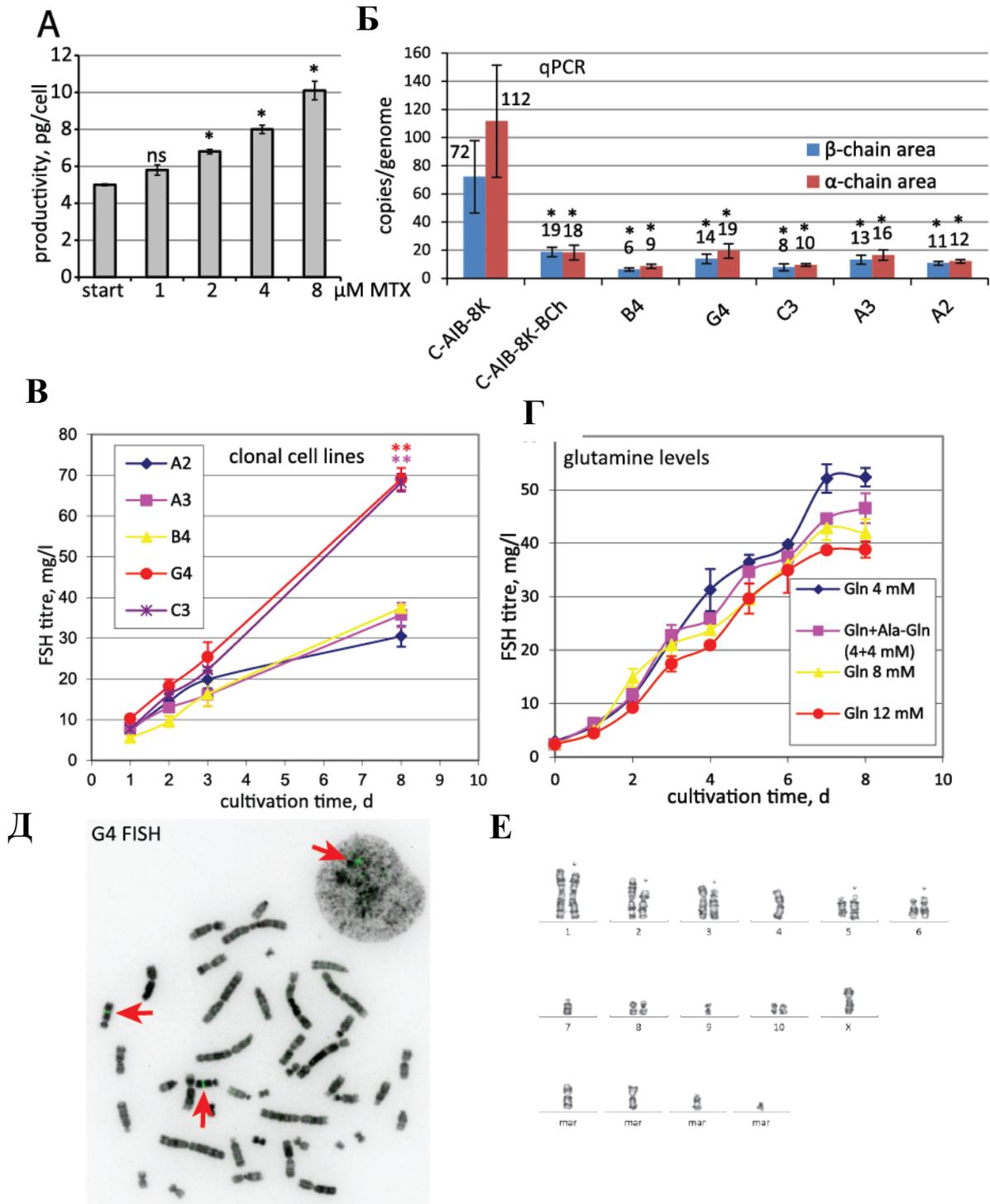


Рисунок 36. Продуктивность, число копий целевого гена, динамика накопления продукта, влияние на нее глутамина и аланил-глутамина, а также FISH-анализ и кариотип амплифицированных и клональных линий клеток-продуцентов ФСГ. А – Уровень секреции ФСГ по данным ИФА, $n=2$. **Б** – количественный ПЦР-анализ числа копий целевого гена в геноме продуцентов, ампликоны для областей ОРС альфа- и бета-цепей ФСГ, на всех панелях рисунка обозначено стандартное отклонение, $n=3$. Звездочкой отмечены образцы, для которых число копий достоверно отличается от контрольного образца C-AIB-8K. **В** – накопление ФСГ по данным ИФА при простой культивации клональных линий-продуцентов, $n=2$, сравнение по критерию Стьюдента с образцами, соответствующими линии A2. **Г** – влияние концентрации глутамина на уровень секреции ФСГ линией клеток G4. **Д** – FISH анализ клеток линии G4 конъюгированным с ФИТЦ ДНК-зондом, комплементарным области ОРС альфа-цепи ФСГ (зеленый канал). Положение флуоресцирующих полос на конденсированной хромосоме 6 и флуоресцирующей области интерфазного ядра обозначены стрелками. **Е** – кариотип клеток линии G4.

4.6.1. Получение и характеристика клональных линий-продуцентов ФСГ

Избыток свободной альфа-субъединицы был скорректирован путем трансфекции клеток популяции С-А1В-8К дополнительной плазмидой p1.2-Hygro-FSH-B-chain, кодирующей бета-субъединицу ФСГ и селекционный маркер устойчивости к гигромицину В. Для полученной поликлональной популяции клеток С-А1В-8К-ВCh по данным иммуноблоттинга наблюдалось падение доли свободной альфа-цепи ФСГ в культуральной среде и значительное падение копийности интегрированных генетических кассет, что может быть вызвано исчезновением из популяции нестабильных вариантов клеток с очень большим числом копий целевого гена при культивации в присутствии уменьшенной концентрации МТХ в течение нескольких недель. Получение клональных линий-продуцентов ФСГ было проведено методом предельных разведений, после нескольких раундов отбора линий с максимальным титром продукта было отобрано 6 кандидатных клональных линий, успешно реадаптированных к суспензионной культивации. Три из них, С-Р1.3-FSH-G4, С-Р1.3-FSH-С3, С-Р1.3-FSH-А3 (далее – G4, С3, А3, соответственно) секретируют незначительные количества свободной альфа-цепи по данным иммуноблоттинга, число копий целевых генов во всех исследованных линиях было весьма небольшим и не имело статистически значимых различий между линиями. Для линии G4 была зафиксирована удельная продуктивность $12,3 \pm 1,7$ пг / клетка / день, что существенно превосходит все известные опубликованные данные.

Культивация всех клональных линий с момента начала клонирования велась без присутствия в среде МТХ и гигромицина, а с момента реадаптации к культивации в суспензионных условиях – без гипоксантина и тимидина. Интересно отметить, что при продолжительной культивации данных линий в перемешиваемых колбах в течение первых трех дней культивирования титр продукта не имел достоверных различий между линиями, но на 8 днях культивирования титр ФСГ для линий G4 и С3 был достоверно (и многократно) выше, чем для других четырех исследованных линий (Рис. 36 В). Варьирование концентрации глутамина в культуральной среде и добавление аланил-глутамина не влияло достоверным образом на титр продукта при четырехдневном культивировании для линии G4, замена базовой культуральной среды Pro CHO 5 (Lonza, Швейцария) на CHO Master (Cell Culture Technologies, Швейцария) с различными уровнями инсулина также не влияло значимым образом на накопление ФСГ при культивировании в течение 8 дней (Рис 37).

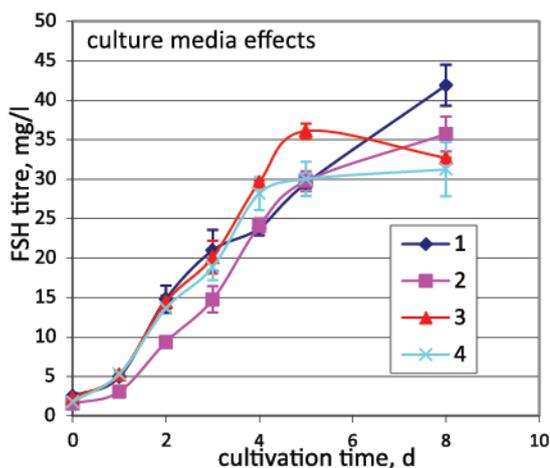


Рисунок 37. Влияние вариантов культуральной среды на накопление ФСГ для линии клеток G4. Обозначения: 1 – среда ProCHO 5, жидкая форма, 2 – среда ProCHO 5, приготовление из порошка, 3 – среда CHO Master с 1 мкг/мл инсулина, 4 – CHO Master с 10 мкг/мл инсулина. Измерение концентрации ФСГ по ИФА, n=2.

Для линий G4 и С3 было проведено исследование постоянства уровня секреции продукта при периодическом культивировании в течение трех месяцев в среде без селекционных агентов. В случае проведения пересевов культуры через 4-5 дней после посева с плотностью 300 тыс. клеток на мл, было обнаружено, что через два месяца после начала культивирования титр продукта существенно падает и продолжает уменьшаться в течение следующего месяца культивирования (Рис 38), одновременно с этим наблюдалось статистически значимое падение числа копий для обоих интегрированных в геном продуцентов плазмид – от 20 до 2-4 копий на геном для плазмиды p1.1-FSH-AIB и от 5-10 до 2-3 копий для плазмиды p1.2-Hygro-FSH-B-chain. После 64 дней культивации было также зафиксировано падение скорости деления обеих линий – от $1,27 \text{ д}^{-1}$ до $1,46 \text{ д}^{-1}$ для линии G4 и от $0,99 \text{ д}^{-1}$ до $1,7 \text{ д}^{-1}$ для линии С3. Предположительно, такое значительное изменение свойств клеток было вызвано их нахождением в течение продолжительного времени при слишком высокой клеточной плотности.

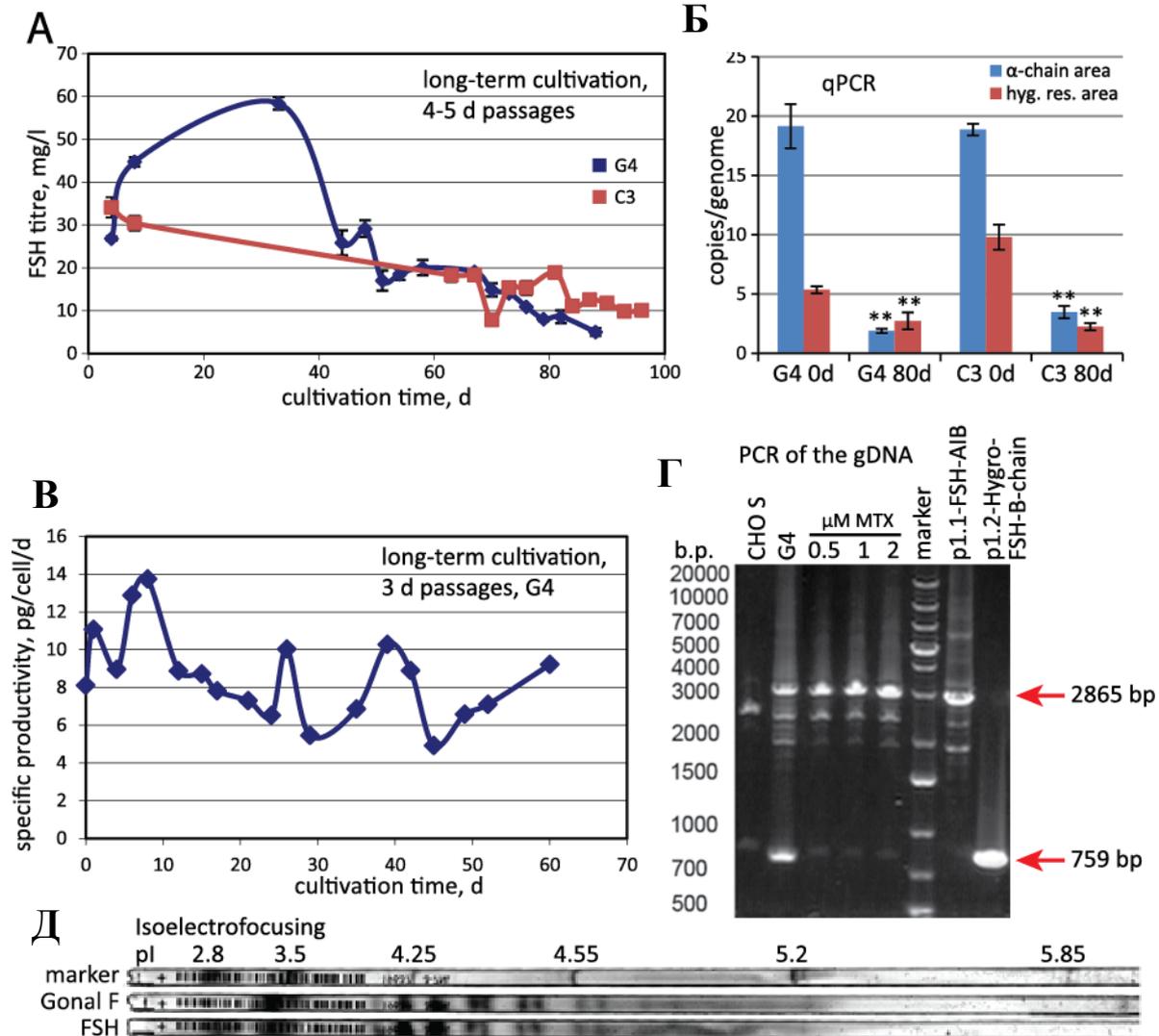


Рисунок 38. Динамика накопления ФСГ при долговременном периодическом культивировании клональных клеточных линий, их генетическая стабильность и распределение изогормонов в очищенном ФСГ по данным ИЭФ. **А** – динамика титра ФСГ по ИФА для линий G4, C3 при культивировании в течение 4-5 дней между пересевами, $n=2$. **Б** – копияность интегрированных плазмид для линий G4 и C3 в момент начала культивирования (0d) и через 80 дней (80d), 4-5 дней между пересевами. “hyg. res. area” – ампликон из области ОРС гена устойчивости к гигромицину В, праймерные олигонуклеотиды RT-HYG-F - RT-HYG-R, $n=3$ для обоих ампликонов. **В** – динамика удельной продуктивности для линии G4 при долговременном периодическом культивировании, пересевы через 3 дня. **Г** – ПЦР-анализ геномной ДНК из клеток G4, нетрансфицированных клеток CHO S и первичных поликлональных популяций, полученных в присутствии 0,5-2 мкМ МТХ. Используются праймерные нуклеотиды SQ-5CH6-F и SQ-3CH1-R. Ожидаемые размеры продуктов ПЦР обозначены стрелками, изображение контрастировано для улучшения видимости минорных полос. **Д** – анализ очищенного ФСГ методом изоэлектрофокусировки, образцы нанесены на гель в невозстанавливающих условиях, окраска Кумасси синим.

Для кандидатной линии G4 было проведено повторное тестирование стабильности свойств при продолжительном культивировании, при этом посевную плотность клеток уменьшили до 200 тыс. на мл, время культивирования до следующего пассажа ограничили 3 днями, а максимальную допустимую клеточную плотность установили как 1,8 млн клеток на мл и при ее достижении пересев культуры производили немедленно. В таких условиях удельная продуктивность клеток G4 оставалась приблизительно постоянной в течение 60 дней культивирования в неселективной среде, что сочли достаточным для получения маточного клеточного банка и его последующего промышленного использования.

Интактность области целевого гена в клетках линии G4 проверяли при помощи ПЦР для геномной ДНК, полученной из материала маточного клеточного банка (12 дней пассирования от исходного исследовательского клеточного банка, (Рис 38). Были использована пара праймерных олигонуклеотидов, комплементарным краям области целевого гена как в плазмиде p1.1-FSH-AIB, так и в плазмиде p1.2-Hygro-FSH-Vch, что соответствовало появлению двух продуктов ПЦР разного размера для исследуемой геномной ДНК. В клетках линии G4 не выявлялись продукты ПЦР, отличные по длине от продуктов, получаемых с контрольных образцов, таким образом при инсерции обеих генетических конструкций в геном клеток не происходило протяженных делеций или инсерций ДНК внутри целевых генов. Отсутствие мутаций в ОРС обеих цепей ФСГ было подтверждено путем ПЦР-амплификации соответствующих областей ОРС, молекулярного клонирования ПЦР-продуктов во вспомогательную плазмиду и секвенирования областей вставки для 3x2 плазмидных клонов. Изменения в ОРС обеих цепей ФСГ не были обнаружены.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* была проведена для клеток линии G4 и ДНК-зонда, направленного к области ОРС альфа-цепи ФСГ, для конденсированных хромосом наблюдали одну полосу гибридизации в плече q хромосомы 6, а для интерфазных ядер – одну область гибридизации, что свидетельствует о встройке и амплификации целевого гена в одной области генома продуцентов и отсутствии транслокаций целевых генов в другие участки генома клеток. Анализ кариотипа клеток линии G4 также не выявил существенных отклонений от родительской линии клеток - X,del(1)(p2.10),del(2)(p1.7p2.9),inv(3)(p2.7q1.3),add(5)(q3.2;?),add(6)(?;p1.1),-7,-9,+4mar.

4.6.2. Получение очищенного ФСГ, пригодного для клинического применения

Выделение и очистку ФСГ проводили из кондиционированной среды после 10 дней выращивания клеток линии G4. Инактивацию потенциально содержащихся в культуре

вирусов проводили непосредственно в осветленной среде при помощи обработки детергентом и растворителем, а именно Tween 80 и три-н-бутил-фосфатом. Целевой белок адсорбировали из закисленной культуральной среды на сорбент Capto MMC и элюировали при одновременном изменении ионной силы и pH в элюирующем растворе, отделение примесных белков проводили при помощи аффинной хроматографии на сорбенте Capture Select FSH-Affinity Matrix. Элюированный с аффинного сорбента ФСГ обессоливали при помощи сорбента Sephadex-G25; при помощи мембраны Sartobind S удаляли из раствора ФСГ остаточные белки СНО и отделившееся от аффинного сорбента мини-антитело. Раствор полностью очищенного от посторонних примесей ФСГ наносили на сорбент Capto Q, удаляли избыток нейтральных изоформ раствором с концентрацией NaCl 60 mM, а затем элюировали ФСГ раствором, содержащим 250 mM NaCl. Финишную очистку ФСГ от следов мультимеров и свободных цепей проводили при помощи гель-фильтрации на сорбенте Superdex 75, одновременно с этим ФСГ переводили в основу фармацевтической композиции – раствор 10 mM фосфатов натрия, pH=7,0. К полученному готовому раствору прототипа субстанции ФСГ добавляли вспомогательные вещества – L-метионин, сахарозу, Твин-20; проводили удаление потенциально присутствующих в растворе вирусов при помощи нанофильтрации, стерилизовали фильтрацией, разделяли на аликвоты и хранили при температуре ниже минус 70 °C для дальнейшего использования. Поскольку разработанный процесс очистки ФСГ включал в себя только линейно масштабируемые хроматографические операции, он может быть использован при промышленном производстве ФСГ практически без изменений.

4.6.3. Характеризация очищенного ФСГ

Для полученного таким образом очищенного ФСГ методом изоэлектрофокусирования было установлено, что он содержит такие же изоформы по заряду молекул, что и оригинальный лекарственный препарат ФСГ «Гонал-ф» (Рис. 38Е) и их доли не имеют существенных различий.

Сравнительный анализ пептидных карт для полного триптического гидролизата очищенного ФСГ и препарата сравнения – Гонал-ф проводили при помощи ОВ-ВЭЖХ и масс-спектрометрического анализа неразделенных гидролизатов. Для проведения анализа ФСГ был освобожден от вспомогательных веществ методом ультрафильтрации. Было установлено, что все видимые пики имеют одинаковое время удерживания и сходную относительную площадь (Рис. 39).

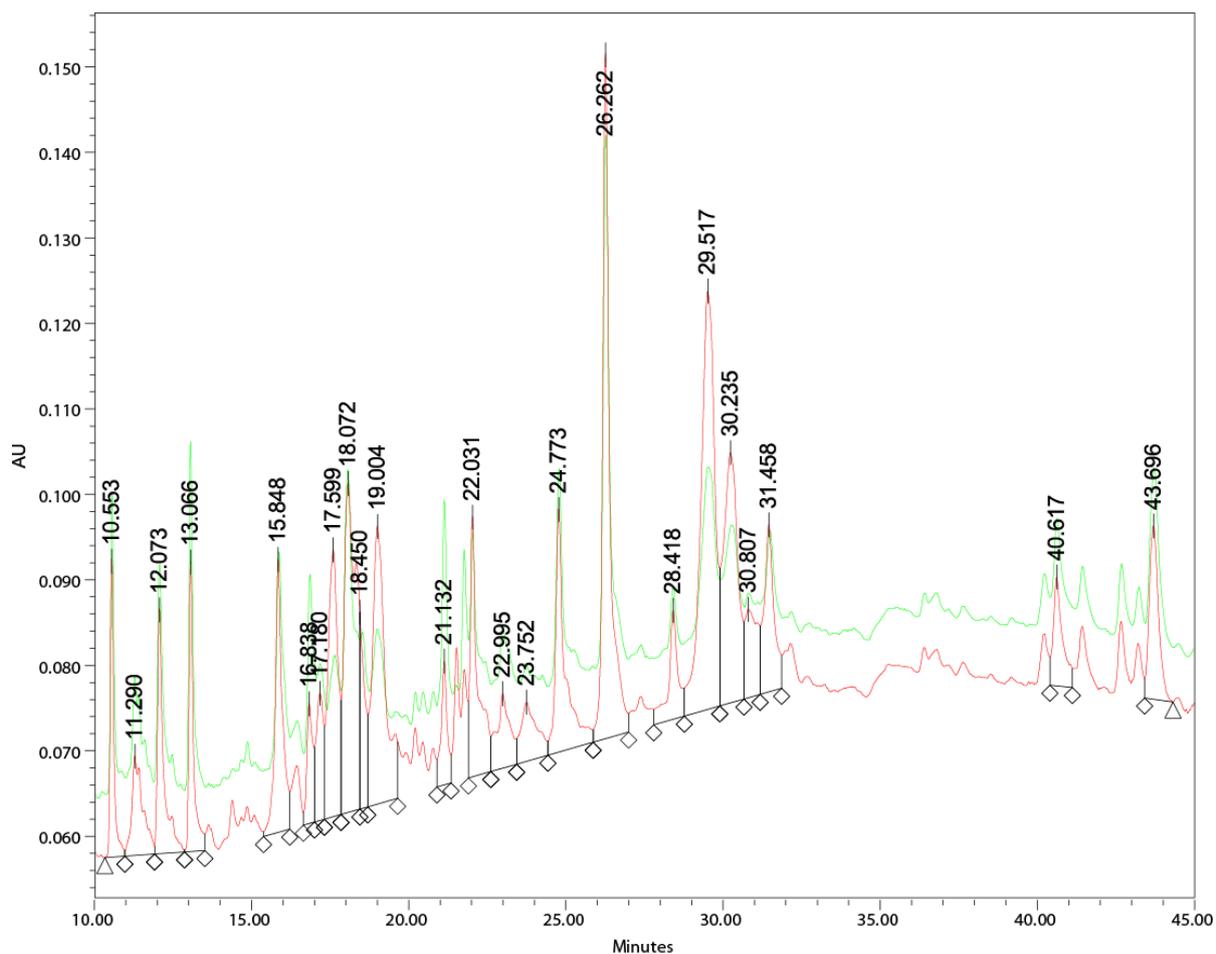


Рисунок 39. Пептидная карта триптических пептидов ФСГ. Обозначения модификаций: Methyl – метилирование, Cys-blocked – блокированный винилпиридином остаток Cys, MetOX – окисление остатка метионина, Na⁺ - присоединение иона натрия вместо протона. Красная линия – опытный образец, зеленая – контрольный образец.

Для всех пептидов, обнаруженных методом MALDI-TOF в гидролизате, был проведено сравнение экспериментально найденных масс с теоретически рассчитанными для ФСГ человека. Выявленный набор пептидов для исследуемого образца перекрывал на 100% последовательности субъединиц ФСГ с учетом неполного расщепления трипсином. Неидентифицированные пептиды могут являться продуктами деградации цепей ФСГ и автолиза трипсина (Таб. 21).

Таблица 21. Масс-спектрометрический анализ триптических пептидов альфа- и бета-цепей ФСГ

Молекулярная масса	Отклонение	от-до	Модификация
<i>Альфа цепь ФСГ</i>			
8277,836	0,0493	1-75	Methyl
10101,557	-0,0261	1-91	Na+
816,449	-0,0053	36-42	-
6381,006	-0,0366	36-92	Cys-blocked
2282,143	0,0420	43-63	-
3621,814	0,0063	43-75	-
5367,440	0,0082	45-92	MetOx
3406,687	0,0206	45-75	-
1938,921	-0,0239	46-63	-
1938,921	0,0370	46-63	Na+
837,442	0,0059	68-75	-
1978,763	0,0389	76-92	-
2711,163	-0,0010	68-91	MetOx
<i>Бета цепь ФСГ</i>			
1546,779	0,0129	1-14	Methyl
5325,494	-0,0089	1-46	Cys-blocked
9799,606	0,0265	1-86	Na+
2514,023	-0,0304	15-35	Na+
7754,650	0,0060	19-86	-
2249,212	0,0007	36-54	Na+
5774,826	0,0314	36-86	Na+
7692,477	0,0273	41-110	Cys-blocked
1007,529	0,0036	55-62	-
1502,630	0,0035	98-111	Methyl

Спектры кругового дихроизма (КД) в дальней и ближней ультрафиолетовой области для очищенного ФСГ и контрольного образца – сконцентрированного ультрафильтрацией и обессоленного Гонал-Ф, также продемонстрировали полное сходство вторичных структур (Рис. 40).

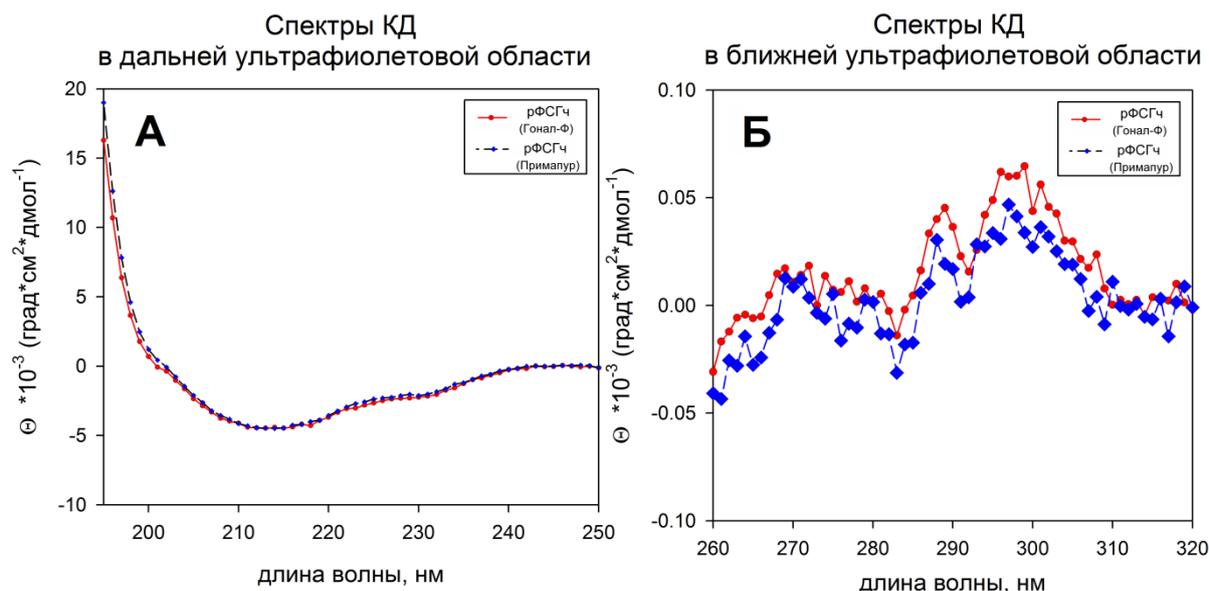


Рисунок 40. Спектры кругового дихроизма (КД) в дальней (А) и ближней (Б) ультрафиолетовой областях сравниваемых образцов ФСГ. Примапур – исследуемый образец.

Спектры на рисунке имеют вид характерный для небольших бета-структурных белков. Положительные значения эллиптичностей в области 195-200 нм означают, что у исследованных белков нет (либо меньше 10%) развернутых участков полипептидной цепи. Совпадение спектров двух образцов на рисунке 1А свидетельствует о том, что белки в обоих образцах имеют одинаковую вторичную структуру. Наличие некоторого сигнала в спектрах КД в области 260-320 нм связано с пространственной укладкой элементов вторичной структуры, или третичной структурой белка. Достаточно хорошее совпадение спектров двух образцов на рисунке 40Б свидетельствует о том, что белки в обоих образцах имеют сравнимую третичную структуру.

Спектры флуоресценции исследуемого образца ФСГ и Гонал-ф приведены на (Рис. 41), небольшие различия в форме спектров могут быть объяснены влиянием буферных растворов в каждом из образцов (Гонал-ф и тестируемый образец использованы без обессоливания). Форма кривых зависимости интенсивности флуоресценции на длине волны 305 нм от температуры образца, то есть кривые плавления, также полностью совпадает для двух образцов, что указывает на одинаковую термостабильность белка в каждом из образцов.

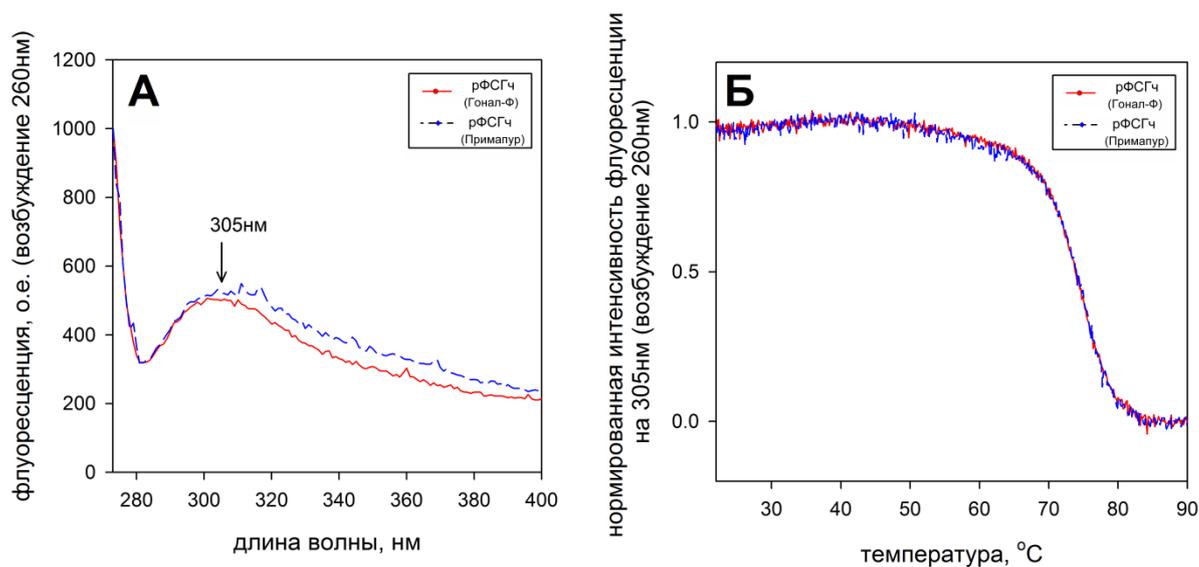


Рисунок 41. Спектр флуоресценции (А) и зависимость интенсивности флуоресценции образцов на длине волны 305 нм от температуры (Б) сравниваемых образцов ФСГ.

Таким образом, результаты спектрального исследования позволяют сделать вывод о сравнимой вторичной и третичной структуре сравниваемых образцов ФСГ в составе препаратов Гонал-Ф® и Примапур®, которые также обладают одинаковой стабильностью, то есть основные физико-химические свойства, по данным проведенного спектрального исследования, совпадают.

Основным фактором, влияющим на гетерогенность по заряду изоформ ФСГ, является содержание кислых остатков сиаловых кислот в N-связанных олигосахаридах ФСГ, поэтому более детальный физико-химический анализ полученного прототипа субстанции ФСГ был в основном сфокусирован на определении долей различных вариантов N-связанных олигосахаридов.

Методами обращеннофазовой ВЭЖХ и ионообменной ВЖХ определено (Таблица 22), что N-связанные гликаны в его составе в основном представлены сильно разветвленными комплексными структурами с несколькими терминальными остатками сиаловой кислоты, около 40% всех обнаруженных структур фукозилированы, при этом уровень фукозилирования выше у более разветвленных структур.

Таблица 22. Варианты N-гликанов в составе ФСГ, полученного при помощи клеток линии G4.

Название структуры	Доля, %
высокоманнозная	2,6
гибридная	1,2
комплексная	96,2
моноантенные fuc /afuc ^a	н/о
биантенные fuc /afuc	13,9/35,0
триантенные fuc/afuc	14,2/11,6
тетраантенные fuc/afuc	11,1/5,1
Заряды гликанов	
нейтральные	2,7
-1	21,2
-2	45,3
-3	21,2
-4	9,7
Заряженные структуры, не связанные с сиаловыми кислотами	
-1	2,2
-2	3,5

^a Fuc – с коровым остатком фукозы, afuc - нефукозилированные. н/о – не обнаружены.

Сиаловые кислоты в составе N-связанных олигосахаридов были в основном представлены N-ацетилнейраминовой кислотой (NANA) и ее биацетилированным вариантом (9,4%), уровень ксеногенной для человека N-гликолилнейраминовой кислоты (NGNA) не превышал 1% (Рис. 42). Такое распределение N-гликанов по размерам, типу и заряду вполне согласуется с ранее опубликованными данными для рекомбинантного ФСГ человека [291, 292].

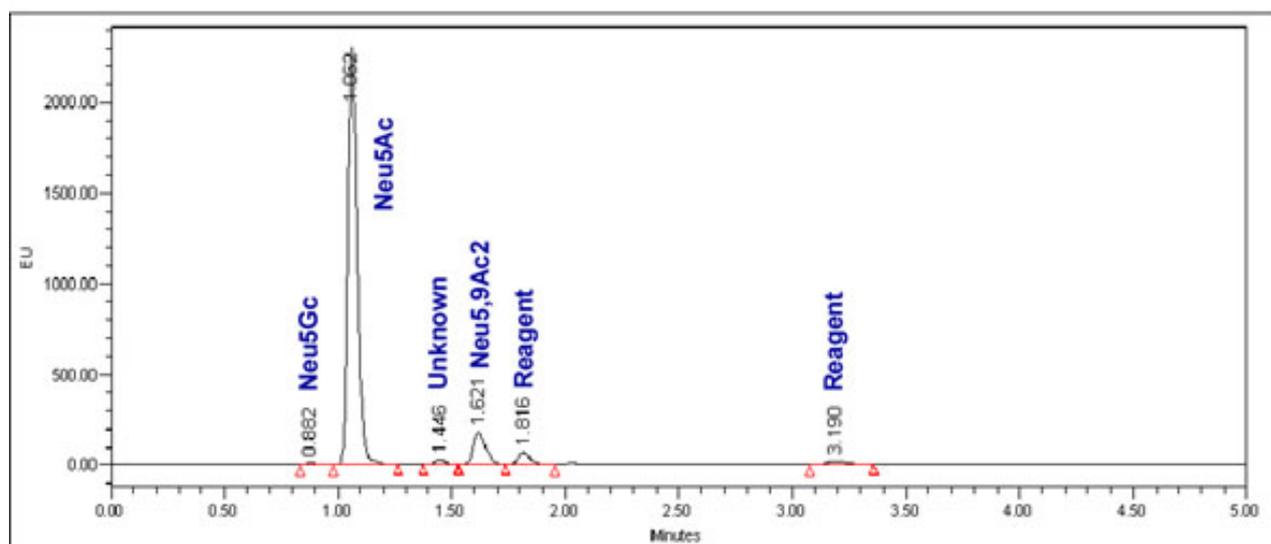


Рисунок 42. Хроматограмма распределения вариантов сиаловых кислот, анализ методом ОФ-ВЭЖХ.

Кинетику взаимодействия очищенного ФСГ с рецептором исследовали методом вытеснения лиганда со связанной радиоактивной меткой. Константу скоростей ассоциации и диссоциации ФСГ и рецептора определяли при помощи инкубации меченного I^{125} – АСУ с мембранной фракцией клеток линии НЕК293, стабильно трансфицированных геном рецептора ФСГ человека. Кривые ассоциации и диссоциации, определенные для двух независимо полученных образцов ФСГ, секретируемого линией G4 и контрольного образца – лекарственного препарата ФСГ Гонал-ф (Рис. 43), не имели достоверных различий друг от друга, что соответствовало сходным значениям кинетических констант и константы диссоциации (Таб. 23).

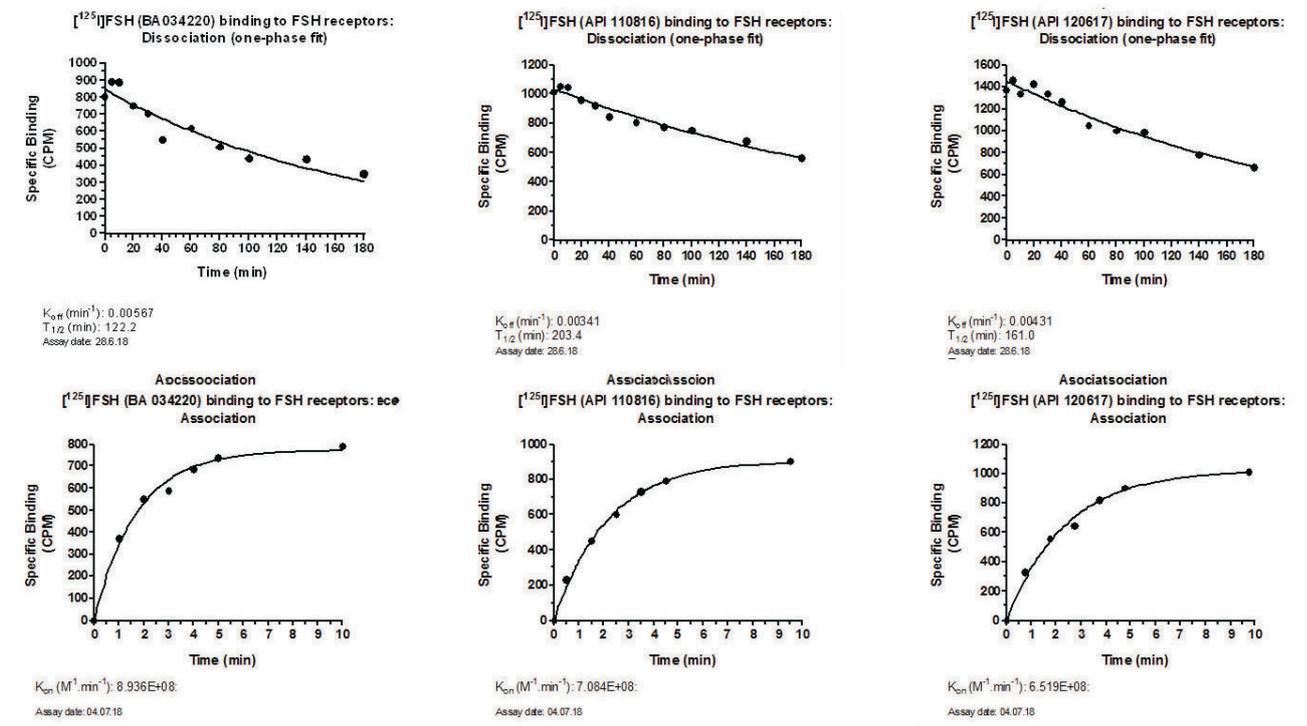


Рисунок 43. Характеристические кривые ассоциации и диссоциации ФСГ и рецептора ФСГ. ВА 034220 – контрольный образец ФСГ Гонал-ф. API 110816 и API 120617 – исследуемые образцы ФСГ.

Таблица 23. Кинетические константы взаимодействия ФСГ с рецептором.

Образец	k_{on} , нМ ⁻¹ *мин ⁻¹	k_{off} , мин ⁻¹	$t_{1/2}$, мин	K_D , пМ
Гонал-ф	0,89±0,23	0,0057±0,0017	134±40	6,3±2,5
API 110816	0,71±0,13	0,0034±0,0006	209±35	4,8±1,2
API 120617	0,65±0,16	0,0043±0,0008	167±31	6,6±2,1

Данные приведены как среднее ± 95% доверительный интервал, n=2.

Биологическую активность очищенного ФСГ исследовали *in vitro* при помощи индикаторной линии клеток гранулы человека, выделяющих прогестерон

пропорционально концентрации биологически активного ФСГ в растворе [293]. Для трех проанализированных образцов ФСГ удельная биологическая активность составила $11,2 \pm 0,9$ МЕ/мкг, что составляет 88% от удельной активности международного стандарта ВОЗ для ФСГ (Рис. 44), (Таб. 24).

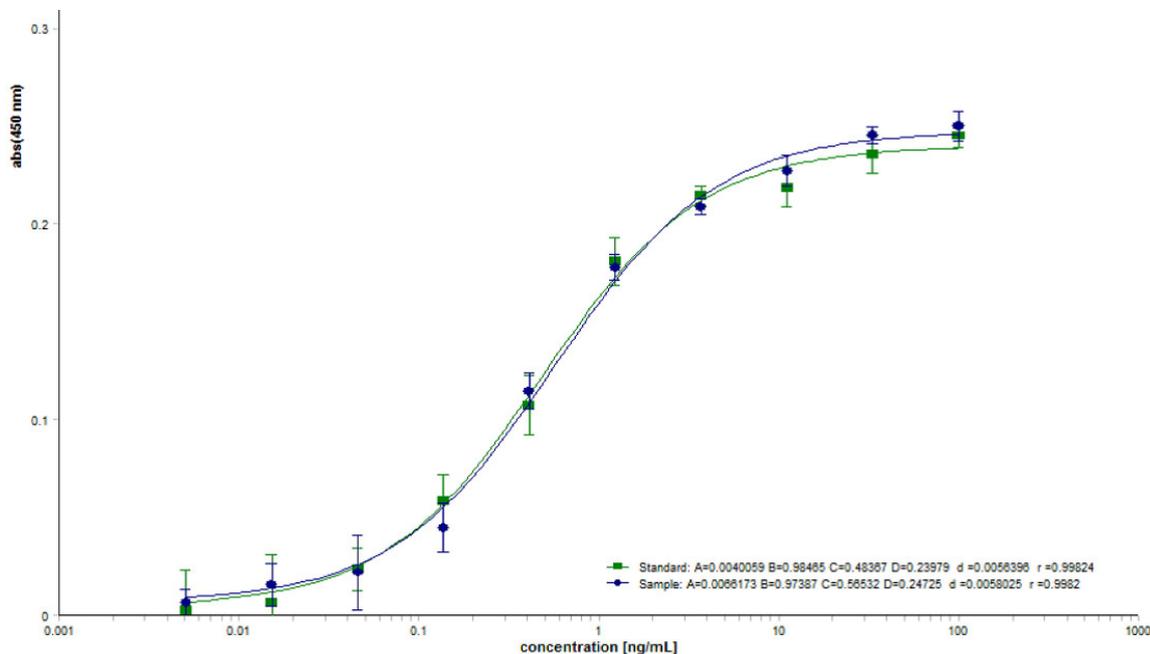


Рисунок 44. Кривая доза-ответ для теста *in vitro* биологической активности ФСГ. Исследуемый образец – голубая линия, 2ой международный стандарт ФСГ – зеленая линия. n=3

Таблица 24. Параметры расчета удельной биологической активности ФСГ в тесте *in vitro*.

№	Удельная активность (МЕ/мкг)	Удельная активность в % от стандарта	Коэффициент наклона кривой (образец/стандарт), %	Верхняя асимптота кривой (образец/стандарт), %
1	10,5	83	105	102
2	12,2	96	95	105
3	10,8	86	99	103

Измерение биологической активности ФСГ *in vivo* проводили традиционным методом Стилмана-Поли [294], то есть путем измерения веса изолированных яичников крыс, получавших инъекции стандарта ФСГ или тестируемого образца (3 разных концентрации), а затем одну инъекцию хорионического гонадотропина. Расчет удельной биологической активности вели методом линейной регрессии с функцией отклика – весом яичников (Рис. 45).

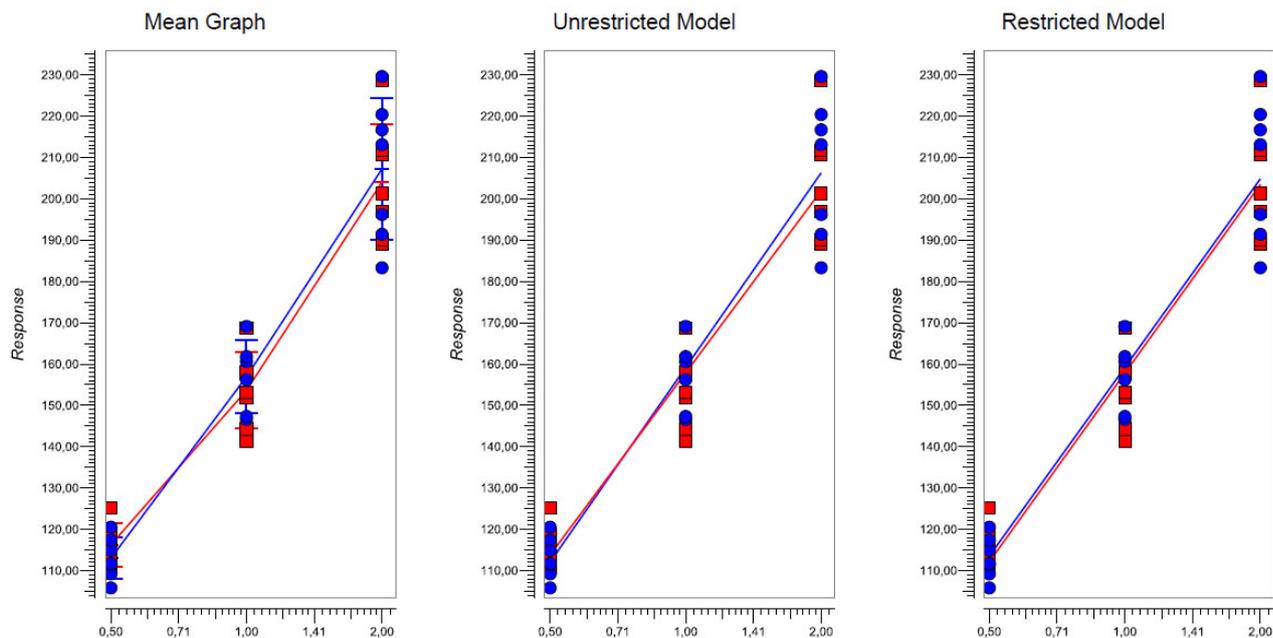


Рисунок 45. Расчет удельной биологической активности ФСГ методом линейной регрессии. По оси ординат – масса яйчников в мг, по оси абсцисс десятичный логарифм ежедневно вводимой дозы ФСГ, в мкг. Синие кружки - стандарт, красные квадраты – исследуемый образец.

Вычисленная удельная активность *in vivo* для очищенного ФСГ из клеток линии G4 составила 13,6 МЕ/мкг (95% доверительный интервал: 12,3-15,1 МЕ/мкг), что очень хорошо соответствует объявленной удельной активности оригинального препарата ФСГ Гонал-ф – 13,636 МЕ/мкг [292].

Таким образом, для всех проведенных исследований структуры белка, связанных олигосахаридов и биологической активности значимые различия между продуктом секреции клеток G4 и препаратом сравнения Гонал-ф не выявлялись.

4.6.4. Фармацевтическая композиция прототипа лекарственного средства ФСГ

Лекарственные препараты ФСГ для клинического применения обычно представляют собой либо лиофилизированный порошок для приготовления раствора для п/к инъекций, либо готовый стерильный раствор, который хранят при температуре +2 - +8 оС в предзаполненных стеклянных шприцах или стеклянных картриджах для ручек-инжекторов. Растворы для однократных шприцов должны быть стерильны и не содержать консервантов, а растворы для многоразового картриджа должны включать консервант, препятствующий росту микроорганизмов при контаминации картриджа в ручке-инжекторе.

Для полученного ФСГ была проведена разработка фармацевтической композиции, не нарушающей прав интеллектуальной собственности других производителей ФСГ, но обеспечивающая хранение ФСГ в течение 24 месяцев без роста доли окисленных форм ФСГ выше 15% и сохранения остальных контролируемых параметров основного вещества. Фармацевтической композиция, включающая 10 мМ фосфатов натрия, рН=7,0, 68,46 г/л сахарозы, 0,5 г/л L-метионина и 0,02% Твин-20 была найдена при ускоренном хранении стеклянных флаконов со стерильными растворами ФСГ при повышенной температуре и анализа растворов по критерию окисленных форм ФСГ. Для данной композиции было продемонстрировано, что ФСГ сохраняет полную биологическую активность и не выходит за рамки фармакопейных требований по уровням родственных примесей при хранении в течение 2,5 лет при температуре +2 - +8 оС в картриджах для шприц-ручек.

4.6.5. Доклинические исследования субстанции ФСГ

Доклинические исследования для созданного прототипа субстанции ФСГ были проведены для лабораторных партий продукта, полученных на лицензированном фармацевтическом предприятии - филиале «Медгамал» НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи группой Д.А. Гусарова по разработанной нами методике культивации клеток и очистки продукта. Определение острой токсичности позволило установить, что для мышей при дозе 5 МЕ/г не наблюдается существенных отличий в клиническом состоянии, спонтанном поведении в группах исследуемого препарата и препарата сравнения (Гонал-ф, Мерк Сероно) по сравнению с контрольной группой, а также нет существенных изменений в приросте массы тела.

При исследовании подострой токсичности в субхроническом эксперименте (28 дней введения препаратов самкам крыс п/к в дозе 0,45 МЕ/г) были найдены следующие отклонения в состоянии животных, получавших исследуемый препарат или препарат сравнения по сравнению с животными контрольной группы:

- 1) Ректальная температура животных в группах ФСГ и Гонал-ф через 28 дней после начала введения препаратов, но не через 14 дней после начала введения, достоверно повысилась по сравнению с контрольной группой - $39,4 \pm 0,3$ °С; $39,1 \pm 0,4$ °С; $38,6 \pm 0,5$ °С, что может указывать как на наличие воспалительной реакции, так и на введение субхронических доз ФСГ.
- 2) Уровень глюкозы в крови был достоверно увеличен для животных, получавших ФСГ и Гонал-ф, измерение через 28 дней после начала введения - $5,83 \pm 0,61$ мМ; $6,01 \pm 0,39$ мМ; $2,86 \pm 0,21$ мМ. Сравнимое повышение уровня глюкозы в опытных

группах может быть следствием увеличения ее потребления и утилизации под воздействием субхронических доз вводимого ФСГ [295, 296].

Последующее патоморфологическое исследование самок крыс, получивших полный курс инъекций ФСГ, Гонал-ф, физраствора либо не получавших инъекций выявило некоторые отличия в состоянии органов животных, получавших инъекции ФСГ или Гонал-ф:

- 1) В интерстициальной соединительной ткани сердца у крыс, получавших ФСГ или Гонал-ф, отмечается стаз и венозная гиперемия, выраженные сильнее, чем в контрольных образцах. Кровенаполнение органа у животных, получавших опытный препарат и препарат сравнения сопоставимо.
- 2) На поверхности слизистой оболочки желудка крыс, получавших ФСГ или Гонал-ф, наблюдаются участки десквамации покровного эпителия и локальные зоны эрозивных повреждений слизистой, затрагивающие верхнюю часть желез. Часть париетальных клеток подвергается гипертрофии. В слизистой отмечается небольшой отек.
- 3) У животных обеих опытных групп наблюдаются эрозивные повреждения толстого кишечника и лейкоцитарная инфильтрация слизистой, их выраженность была несколько выше у животных, получавших исследуемый препарат.
- 4) Кровенаполнение синусоидов коры и мозгового вещества надпочечников для крыс опытных групп выше, чем в контроле. Также отмечается более выраженная в опытных группах гиперемия вен мозгового вещества.
- 5) У животных, получавших исследуемый препарат и препарат сравнения Гонал-ф наблюдались изменения гемо циркуляции в печени. В обеих группах отмечались, более выраженные, чем в контроле, стаз синусоидов, а также центральная и портальная гиперемия. Они были несколько больше у животных, получавших исследуемый препарат, чем у животных, получавших Гонал-ф. В обеих опытных группах отмечалась слабая или умеренная перипортальная лейкоцитарная инфильтрация.
- 6) У животных, получавших исследуемый препарат, степень кровенаполнения сосудов коры и юкстамедуллярной зоны почек была выше, чем в контроле и в группе Гонал-ф. Количество канальцев с детритом было несколько больше в группе Гонал-ф, также для этих животных наблюдали изредка встречающиеся участки периваскулярной лейкоцитарной инфильтрации.
- 7) У крыс опытных групп в слизистой бронхов выявлены участки лейкоцитарной инфильтрации и умеренное расширение микрососудов. Межальвеолярные септы

также имели лейкоцитарную инфильтрацию. В сосудах в обеих группах отмечаются гиперемия и стаз.

- 8) В обеих опытных группах наблюдается слабый периваскулярный и перицеллюлярный отек головного мозга, степень которых не отличается между опытными группами.
- 9) Для опытных групп крыс наблюдали множественные фолликулы на разных стадиях развития и желтые тела, что соответствует фармакодинамической активности обоих препаратов.

Оценка места инъекции – холки животных выявила наличие в глубоких слоях дермы и на границе с подкожной клетчаткой кровоизлияний, сопровождаемых зонами лейкоцитарной инфильтрации, а также отека, но не областей некроза или иных необратимых изменений тканей. Такое состояние места инъекций подтверждает, что исследуемый препарат (и препарат сравнения) хорошо переносится в месте инъекции. Разработанная нами фармацевтическая композиция оказалась пригодной для использования *in vivo*. Воспаление в месте инъекции на протяжении продолжительных 28-дневных инъекций может являться следствием непредсказуемого ответа животных на инъекции рекомбинантного белка человека и не различается между группой исследуемого препарата и Гонал-ф.

Общие результаты патогистологического исследования органов крыс свидетельствуют об отсутствии существенных патологических изменений микроструктуры большинства изученных органов по сравнению с животными контрольной группы. Обнаруженные изменения сходны для исследуемого препарата и Гонал-ф, а также коррелируют с известными побочными эффектами препарата Гонал-Ф®.

4.6.6. Клиническое исследование лекарственного препарата ФСГ

Клиническое исследование фазы I для разработанного препарата ФСГ (воспроизведенный препарат МНН фоллитропин альфа, торговое название Примапур) было проведено как однократное подкожное введение 300 МЕ исследуемого препарата и препарата сравнения Гонал-ф 24 здоровым добровольцам женского пола. Участники исследования были рандомизированы, было проведено перекрестное введение препаратов ФСГ для минимизации случайных ошибок в определении фармакокинетических параметров, вызванных индивидуальными особенностями участников исследования.

Как видно из (Таб. 25), исследуемый препарат ФСГ продемонстрировал сходные с препаратом сравнения значения пиковой концентрации и «площади под кривой»; двусторонние доверительные интервалы для этих величин не выходили за рекомендуемый

диапазон 80-125% [297], остальные фармакокинетические параметры препаратов не имели достоверных отличий друг от друга.

Таблица 25. Фармакокинетические параметры ФСГ в сыворотке крови добровольцев.

Параметр	исследуемый препарат	Гонал-ф	90% доверительный интервал
C_{max} , мМЕ/мл	14,3±4,7	16,0±4,9	87,9% (82,8%, - 93,3%)
T_{max} , ч	18,7±5,8	19,2±4,9	
AUC_{0-192} , ч	1203±467	1241±418	93,3% (87,3%, - 99,8%)
$T_{1/2}$, ч	70,8±32,5	71,7±33,5	
K_{cl} , л/ч	0,01	0,01	

C_{max} — величина максимальной концентрации ФСГ в сыворотке крови,

T_{max} — время достижения максимальной концентрации в сыворотке крови,

AUC_{0-192} — площадь под фармакокинетической кривой “концентрация—время”, начиная с нулевого значения и до последнего забора крови через 192 ч,

$T_{1/2}$ — период полувыведения,

K_{el} — явная константа скорости терминального периода полувыведения.

$n=23$, образцы сыворотки крови для одного добровольца были утеряны вследствие разморозки контейнера при транспортировке.

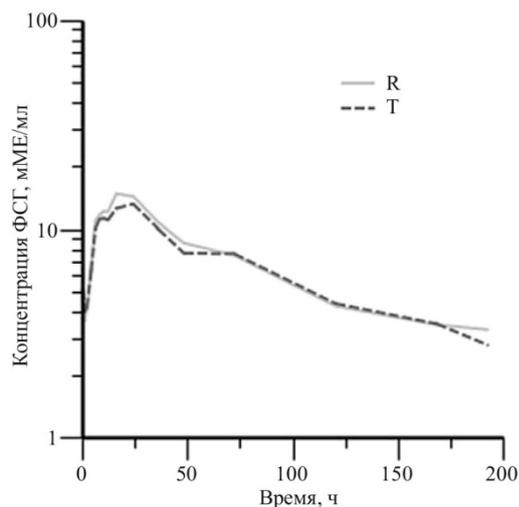


Рисунок 46. Усредненные фармакокинетические кривые концентрации ФСГ, добровольцы после однократного введения. Т- исследуемый препарат, R – препарат сравнения. Логарифмическая шкала по оси ординат.

Приведенные на Рис. 46 фармакокинетические кривые также демонстрируют крайнее сходство препаратов. Вычитания уровня эндогенного ФСГ для участниц исследования не проводили ввиду его высокой вариабельности. В ходе исследования было зафиксировано 34 нежелательных явления (НЯ), из которых 17 НЯ наблюдали после введения препарата сравнения, 14— после введения исследуемого препарата и 3 НЯ отмечали во время периода скрининга. В 2 случаях степень тяжести НЯ определялась как средняя, в остальных случаях

(32) — легкая. Большая часть НЯ была связана с изменениями параметров свертывания крови.

Таким образом, было установлено, что полученные в условиях опытно-промышленного производства в ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи партии секретиремого клетками линии G4 ФСГ, при их использовании в доклинических и клинических исследованиях фаз I и III (код исследования NCT03088137 в базе данных clinicaltrials.gov), демонстрируют отсутствие токсичности, сходную с оригинальным препаратом ФСГ Гонал-ф фармакокинетику и обладает сравнимой с Гонал-ф клинической эффективностью. В настоящий момент идет рассмотрение полного регистрационного досье лекарственного препарата ФСГ Примапур в Минздраве РФ.

Относительно высокая удельная продуктивность линии C-P1.3-FSH-G4 позволила на порядок увеличить конечную концентрацию ФСГ в ростовой среде по сравнению с ранее существовавшими линиями-продуцентами и упростить промышленный процесс производства ФСГ, а именно проводить все операции выделения и очистки продукта на одном промышленном жидкостном хроматографе и не использовать машины для ультрафильтрации, что, в свою очередь, позволяет крайне существенно уменьшить затраты на организацию такого промышленного производства и уменьшить операционные расходы на получение партий продукта.

На примере ФСГ было продемонстрировано, что при расположении областей ОРС цепей гетеродимерного белка в составе одного искусственного оперона и их соединении EMCV IRES дикого типа наблюдается преимущественная секреция клетками свободной альфа-цепи ФСГ (первый цистрон) и для изменения паттерна секреции к преимущественному накоплению в среде гетеродимерного ФСГ требуется введение в геном клеток дополнительной плазмиды, кодирующей только бета-цепь ФСГ. Было предположено, что секреция преимущественно гетеродимерного белка будет возможна при ко-трансфекции клеток СНО парой плазмид на основе вектора p1.1, кодирующих цепи гетеродимерного белка и селекционные маркеры DHFR и глутаминсинтетазу (GS) и их последующей ко-амплификации под действием возрастающих концентраций селекционных агентов – MTX и ингибитора GS метионилсульфоксимины (MSX).

4.7. Одновременная амплификация пары экспрессионных плазмид в геноме клеток-продуцентов. Получение продуцентов лютеинизирующего гормона

4.7.1. Возможность ко-амплификации пары плазмид на примере модельных флуоресцентных белков

Для пары флуоресцентных белков – eGFP и mCherry были получены плазмиды p1.1-Cherry и p1.2-GS-eGFP (Рис. 47) и было показано, что векторы семейства p1.1 с селекционными маркерами дигидрофолатредуктазы и глутаминсинтетазы при ко-трансфекции в клетки линии CHO DG44 позволяют получить поликлональную популяцию клеток, в которой около 70% клеток экспрессируют оба гена (Рис. 48).

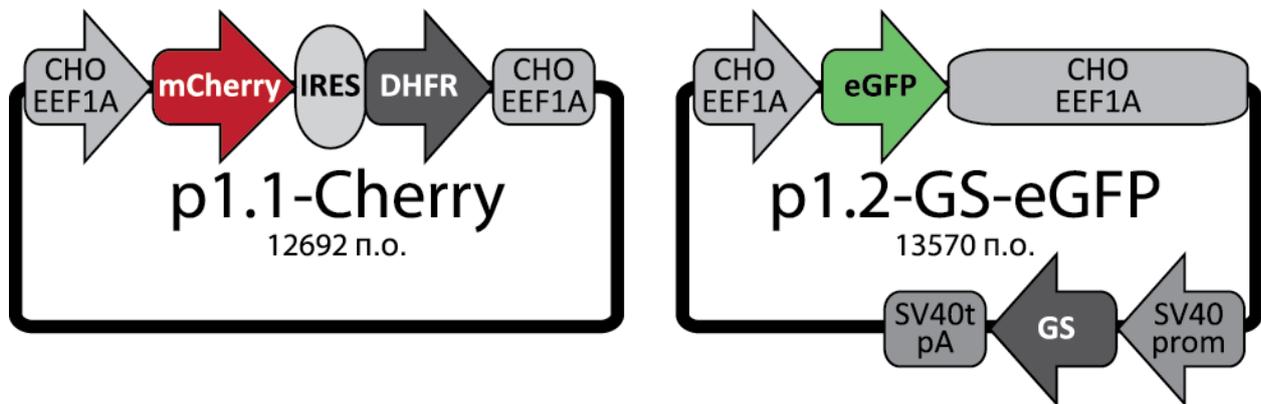


Рисунок 47. Схемы использованных генетических конструкций. mCherry - ОПС красного флуоресцентного белка; eGFP - ОПС зеленого флуоресцентного белка; CHO EEf1A1 - районы, фланкирующие ген EEf1A1 китайского хомячка, содержащие промотор, первый интрон, терминатор и сигнал полиаденилирования гена EEf1A1; IRES – внутренний сайт связывания рибосом из вируса EMCV; DHFR – ОПС дигидрофолатредуктазы мыши; SV40p и SV40t - промотор и терминатор вируса SV40; GS – ОПС глутаминсинтетазы крысы.

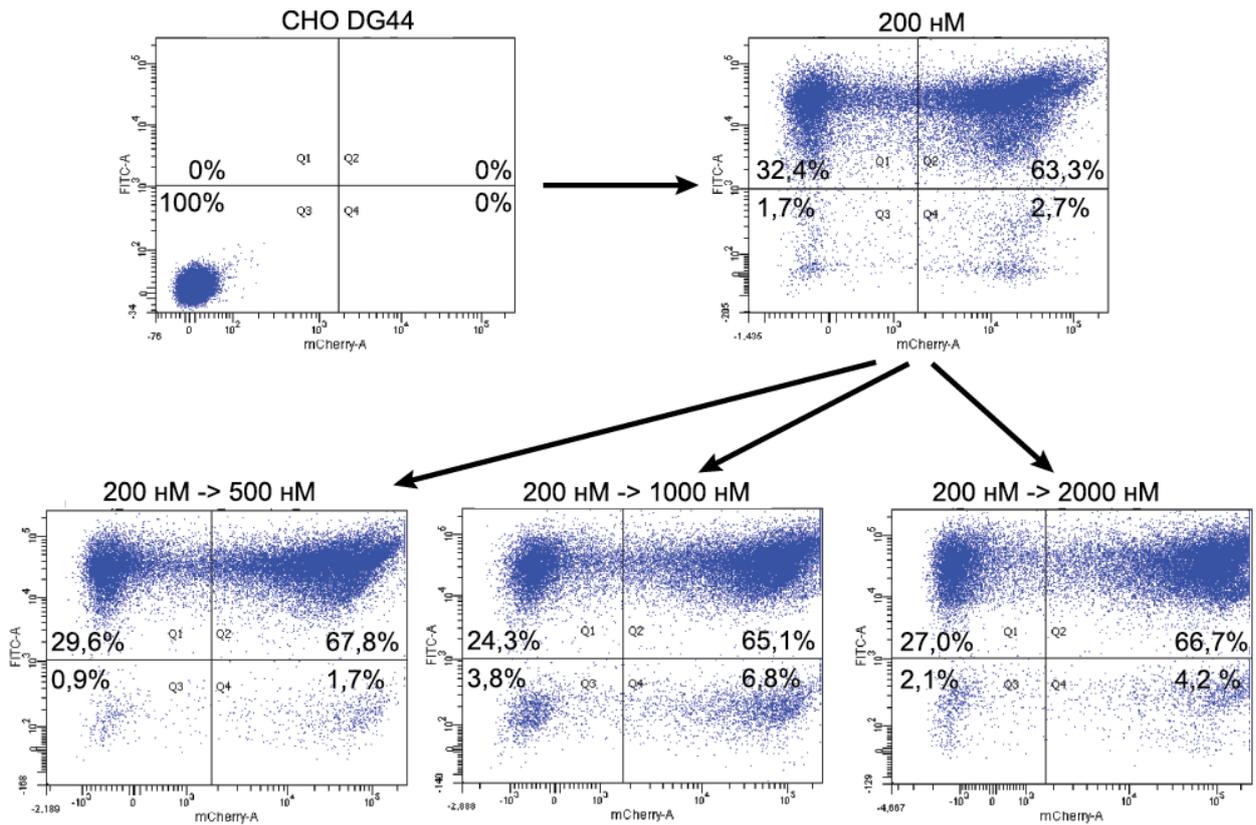


Рисунок 48. Распределение клеток по интенсивностям флуоресценции белков mCherry и eGFP по данным проточной цитофлуориметрии. Приведены данные для одиночных жизнеспособных клеток; доли клеток, отнесенных к соответствующим квадрантам, приведены на панелях рисунка, не менее 1×10^5 клеток для каждого измерения. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции для белка mCherry, по оси ординат – для eGFP.

Последующая одностадийная амплификация интегрированных в геном клеток генетических кассет под действием метотрексата позволяет увеличить уровень экспрессии обоих интегрированных генов до 8,2% eGFP, 9,9% mCherry от общего белка, что соответствует увеличению копияности интегрированных в геном кассет. (Рис. 49).

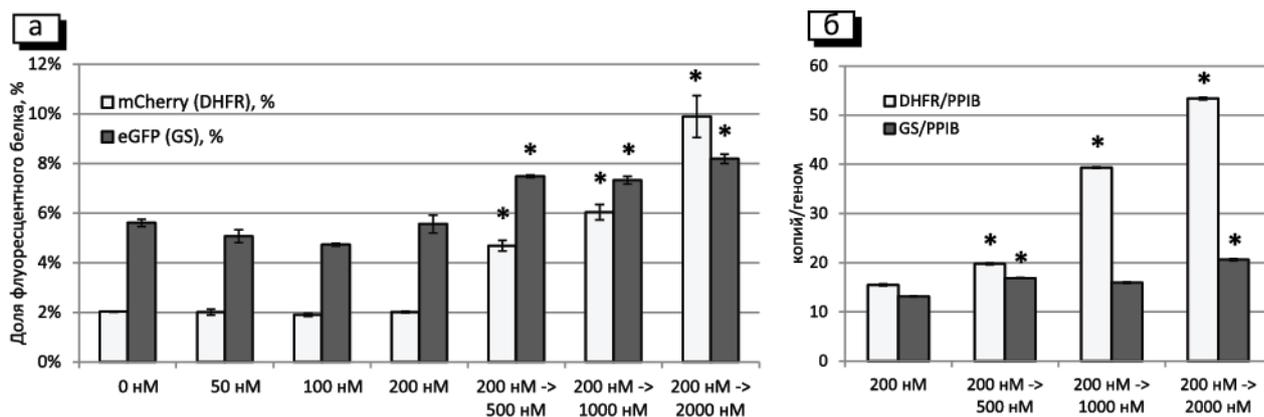


Рисунок 49. Содержание флуоресцентных белков и копияность интегрированных генетических кассет для стабильно трансфицированных и прошедших амплификацию клеточных популяций. (а) – доли флуоресцентных белков в общем внутриклеточном белке клеток. Абсолютные концентрации флуоресцентных белков определены против стандартов, общий белок по Брэдфорд. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям, $n=3$; приведено 1 репрезентативное измерение из трех. (б) - Копийность областей селекционных маркеров в геноме стабильно трансфицированных популяций, определенная методом ПЦР-РВ. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям, $n=3$; приведено 1 репрезентативное измерение из трех, нормирование проведено по ампликону из области гена *PP1B*, однокопийного по данным секвенирования генома СНО. Звездочками обозначено наличие статистически значимого (критерий Стьюдента, $p<0,05$) различия значения параметра со значением для образца «200 нМ».

Разработанный метод может быть использован для получения стабильных линий-продуцентов функциональных гетеродимерных белков, в частности, гормонов и терапевтических антител.

4.7.2 Многостадийная ко-амплификация пары плазмид на примере лютеинизирующего гормона человека

Для согласованной экспрессии генов субъединиц ЛГ человека в клетках СНО было получено 2 пары плазмид – $p1.1-LH-\alpha + p1.2-GS-LH-\beta$ (вариант LHA) и $p1.1-LH-\beta + p1.2-GS-LH-\alpha$ (вариант LHB) (Рис. 50). Пары плазмид были трансфицированы в клетки линии СНО DG-44, уровни секреции ЛГ приведены в (Таб. 26)

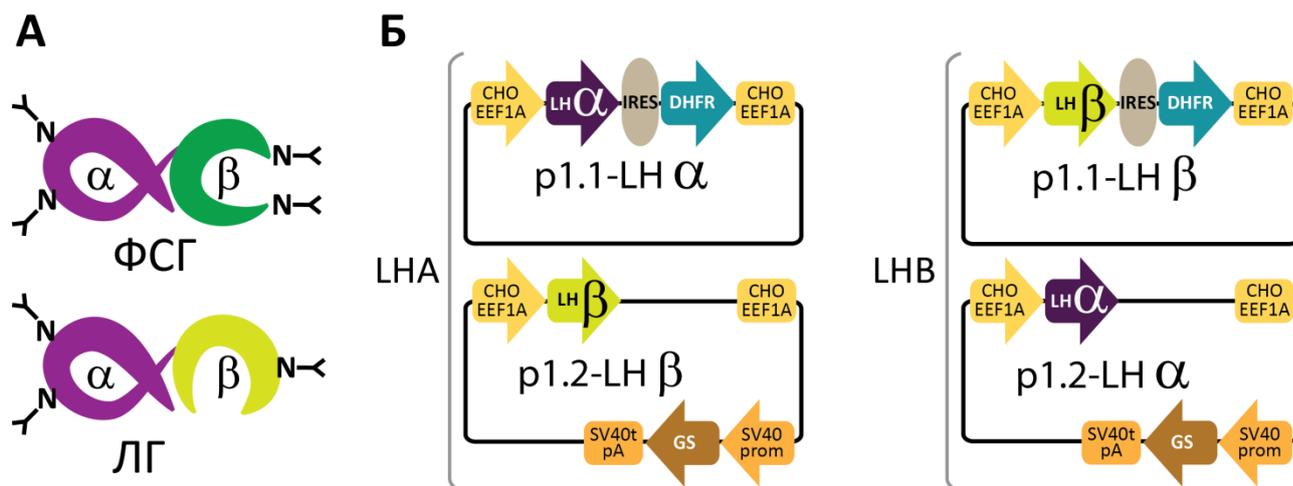


Рисунок 50. Структура гонадотропных гормонов ФСГ и ЛГ (А) и карты экспрессионных плазмид, кодирующих цепи ЛГ (Б). Альфа-субъединицы этих гормонов идентичны и содержат два сайта N-гликозилирования. Бета-субъединица ЛГ содержит один сайт N-гликозилирования, ФСГ - два сайта N-гликозилирования. LH α - ОРС α -цепи цепи лютеинизирующего гормона; LH β - ОРС β -цепи цепи лютеинизирующего гормона; CHO EEf1A1 - районы, фланкирующие ген EEf1A1 китайского хомячка, содержащие промотор, первый интрон, терминатор и сигнал полиаденилирования гена EEf1A1; IRES – внутренний сайт связывания рибосом EMCV; DHFR – ОРС дигидрофолатредуктазы дигидрофолатредуктаза мыши; SV40p и SV40t - промотор и терминатор вируса SV40; GS – ОРС глутаматсинтетазы глутаматсинтетазы мыши.

Таблица 26. Основные параметры популяций клеток, трансфицированных парами плазмид LNA и LNB.

Пара плазмид	LNA	LNB
Эффективность трансфекции, %	20	46
Титр ЛГ через 48 ч после трансфекции, нг/мл	0,8	17
Продуктивность популяций клеток через 48 ч после трансфекции, нг/млн клеток	4,9	180
Удельная продуктивность в стабильно трансфицированных популяциях, пг/клетка/день	0,297	0,103
Время удвоения клеток, ч	48,5	37

Поскольку предполагалась более быстрая амплификация в геноме плазмид с селекционным маркером DHFR, для многостадийной амплификации был выбрана стабильно трансфицированная популяция клеток LNB.

Была исследована возможность амплификации или вторичной селекции клеток в популяционной популяции с концентрацией MSX, увеличенной до 25 мкМ при одновременном увеличении концентрации MTX до 500 нМ. Обнаружено, что одновременное увеличение концентраций двух селекционных агентов MSX и MTX дает меньший прирост копийности целевых генов по сравнению с увеличением концентрации одного MTX (Рис. 51 А). Амплификацию целевых генов в популяционной культуре вели путем

последовательного повышения концентрации МТХ при постоянной концентрации MSX 50 нМ (Рис. 51Б). После проведения 4-х шагов амплификации при конечной концентрации МТХ 8 мкМ была получена популяция клеток с удельной продуктивностью 2,2 пг/клетка.

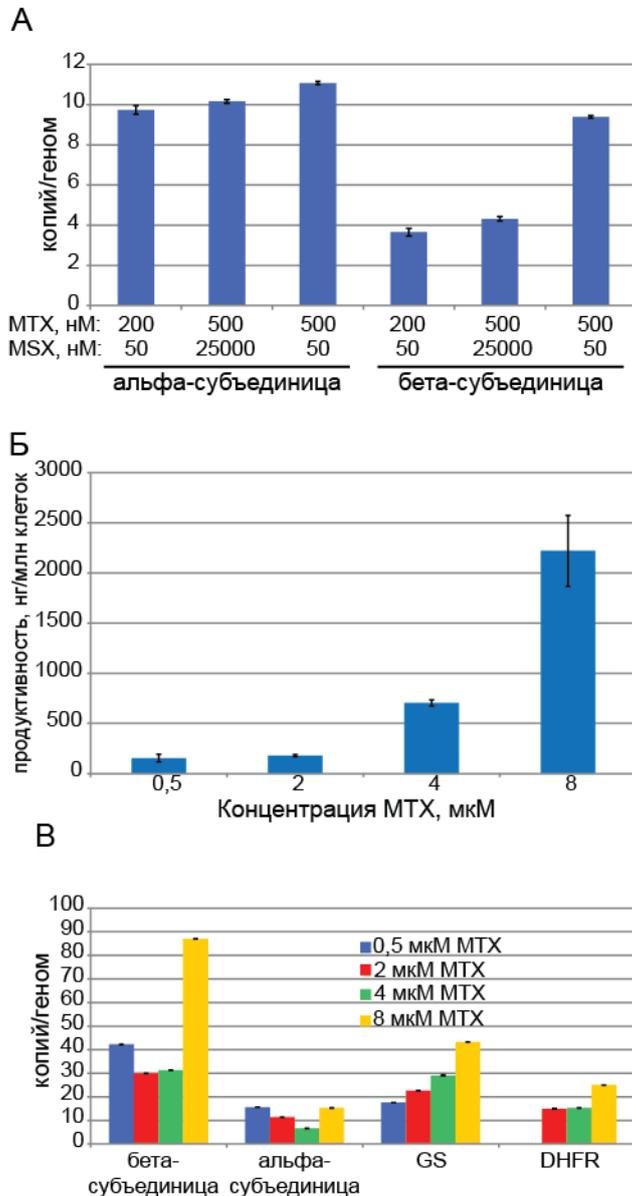


Рисунок 51. Динамика копийности генов альфа- и бета- субъединиц ЛГ в геноме стабильно трансфицированных клеток СНО и продуктивность популяций клеток при увеличении концентрации МТХ и MSX. (А) Динамика копийности генов при одновременном повышении уровней МТХ и MSX. (Б) Изменение продуктивности клеток при последовательном повышении концентрации МТХ. (В) Зависимость копийности генетических конструкций в геноме от концентрации МТХ методом ПЦР-РВ. Данные приведены как среднее, n=3-4 для ПЦР-РВ, n=2 для ИФА, планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению.

Параллельно с этим из первичной популяции стабильно трансфицированных клеток были получены клональные линии клеток и для 6 линий с наибольшей продуктивностью был

проведен один шаг геномной амплификации. Только для одной линии из 6 наблюдалось увеличение удельной продуктивности клеток, такой способ получения высокопродуктивных продуцентов, по-видимому, непригоден для используемых нами плазмидных векторов p1.1 (Рис 52).

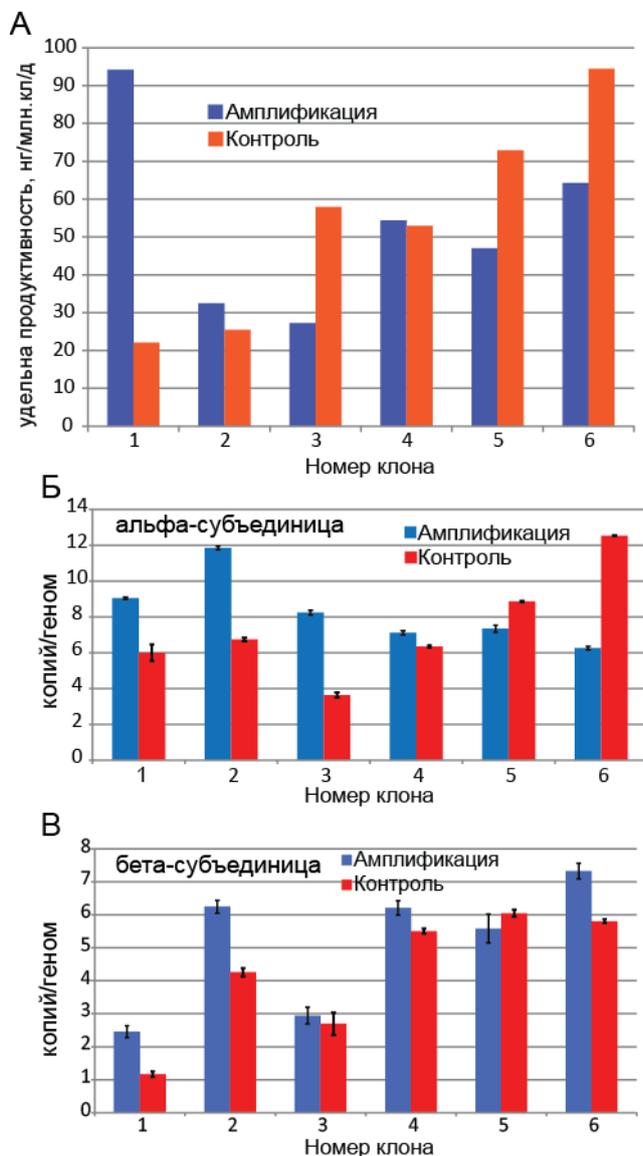


Рисунок 52. Изменение продуктивности клеток и копийности целевых генов цепей ЛГ в геноме клеток при геномной амплификации клональных клеточных линий. (А) – продуктивность клеток по ИФА, (Б) – копийность гена альфа-субъединицы ЛГ, (В) – копийность гена бета-субъединицы ЛГ.

Потенциально промышленно пригодные клеточные линии, секретирующие значительные количества гетеродимерного ЛГ без значимой примеси свободной субъединицы, могут быть получены при помощи пары плазмидных векторов, кодирующих гены субъединиц ЛГ и селекционные маркеры DHFR или GS. Ко-трансфекция плазмид и последующая их амплификация в геноме клеток-продуцентов под действием метотрексата

позволяет многократно увеличить уровень биосинтеза обеих субъединиц ЛГ. Тем не менее, удельная продуктивность полученных линий и популяций клеток, секретирующих ЛГ, была значительно ниже, чем удельная продуктивность полученного нами ранее клонального продуцента ФСГ. Можно предположить, что в случае плазмиды p1.1 и ее производных вероятность успешной ко-амплификации пары плазмид остается недостаточно высокой для уверенного практического применения и конструкции с полицистронными матрицами остаются предпочтительным вариантом для получения промышленных продуцентов гетеродимерных белков.

4.8. Создание искусственных гликопротеидов методом химической конъюгации с полисиаловой кислотой

В некоторых случаях негликозилированный или слабо гликозилированный белок может быть химически модифицирован путем конъюгации с гомополимером сиаловой кислоты. Такие конъюгаты имеют многократно увеличенный период полувыведения из системной циркуляции за счет увеличения веса и размера белковой молекулы и в этом качестве могут быть использованы в клинической практике. В данной работе в качестве полисиаловой кислоты был использован гомополимер N-ацетилнейраминовой кислоты, выделяемый из клеточной стенки *E.coli* и активированный до альдегидной формы окислением иодидом натрия.

4.8.1. Получение чистого препарата конъюгата инсулина и полисиаловой кислоты

Общий метод конъюгации инсулина и окисленной полисиаловой кислоты был предложен проф. Грегориадисом и сотрудниками [239] и состоял в проведении реакции между N-концевыми аминогруппами в составе цепей инсулина и альдегидными группами, находящимися на конце полимера сиаловой кислоты. Образующееся основание Шиффа подвергалось восстановлению до вторичного амина при помощи цианоборгидрида натрия. Данная химическая реакция оставалась достаточно специфичной при ее проведении при слабокислом pH, однако разделение одно- и дву-замещенных вариантов инсулина и даже отделение остаточного свободного инсулина от однозамещенного конъюгата не было достигнуто.

В ходе настоящей работы был уточнен метод синтеза конъюгата инсулина и разработан процесс его очистки, приводящий к получению действительно гомогенного продукта.

Для проведения первоначальных экспериментов по определению биологических свойств конъюгата был использован трехкратный молярный избыток окисленной полисиаловой кислоты, фракция 14 кДа, реакцию проводили в водной среде при pH=6,0 при температуре +37 °С, конечная концентрация инсулина – 10 г/л, NaCNBH₃ – 4 г/л. Степень конверсии инсулина определяли методом ОФ-ВЭЖХ, максимальная конверсия достигалась через 3 ч от начала реакции и в дальнейшем практически не возрастала (данные не приводятся). Степень превращения инсулина в конъюгат составила около 50%, что соответствует степени превращения полисиаловой кислоты около 15%, полученный продукт был подвергнут двухстадийной хроматографической очистке методами обращеннофазовой хроматографии в системе вода-этанол, ион-парный агент триэтиламмоний ацетат, pH=6,5 (Рис. 53) и последующей анионообменной хроматографии с элюцией продукта в градиенте концентрации NaCl.

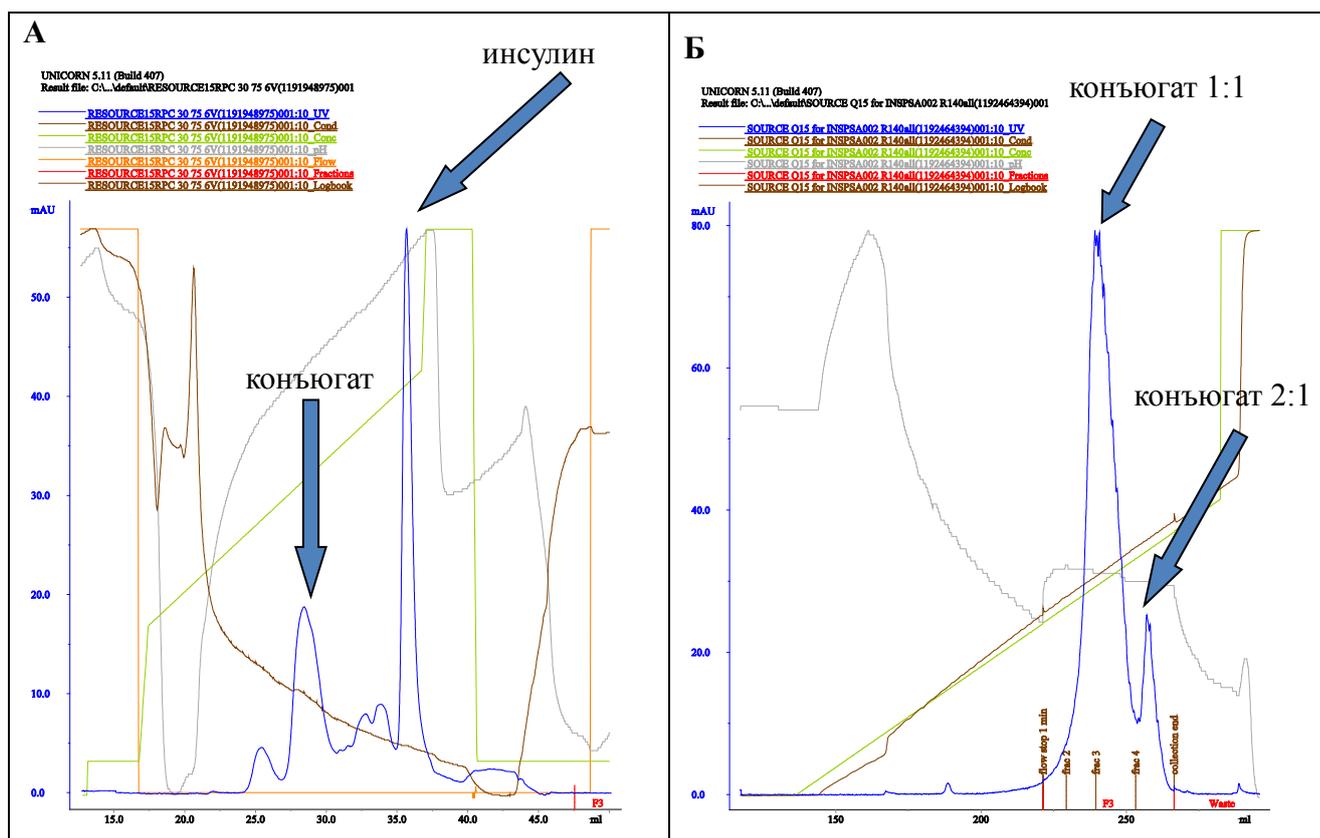


Рисунок 53. Хроматограммы процесса очистки конъюгата инсулина и полисиаловой кислоты. А – ОФ-ВЭЖХ, Б – ионообменная ВЭЖХ. Объем элюции указан в мл, по шкале ординат приведена оптическая плотность элюата, О.Е., длина волны 280 нм.

Анализ фракций элюата для первой стадии очистки показал, что варианты конъюгата и побочные продукты реакции могут быть достаточно эффективно разделены (Рис 54), даже

I операция по очистке продукта приводит к получению значительно более гомогенного конъюгата, чем продукт, полученный и очищенный согласно процедуре, приведенной в [239].

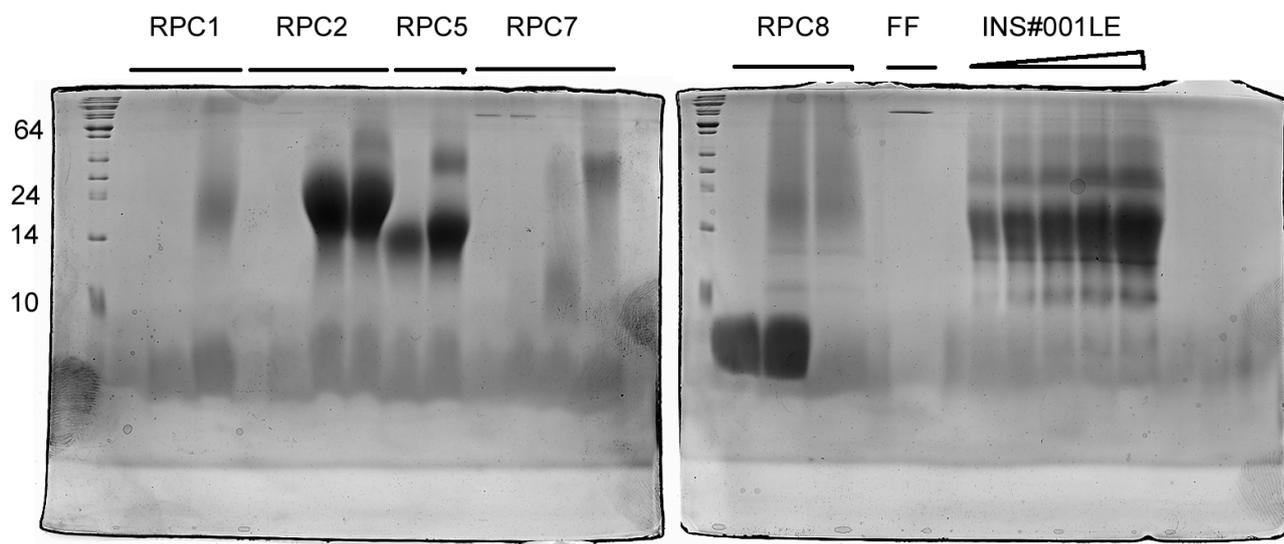


Рисунок 54. Гель-электрофореграмма фракций элюата с первой стадии очистки конъюгата инсулина и полисиаловой кислоты. Молекулярные массы приведены в кДа, невозстанавливающие условия, окраска Кумасси синим. Обозначения – INS#001LE – контрольный образец очищенного конъюгата, 1,2,4,8,16 мкг. RPC1 – RPC 8 – последовательные фракции элюции при ОФ-ВЭЖХ. FF – фракция не связавшихся с сорбентом при ОФ-ВЭЖХ белков.

Для полученного конъюгата инсулина и полисиаловой кислоты было продемонстрировано, что полностью очищенный конъюгат (Ins-PSA), в отличие от свободного инсулина и Ins-PSA, прошедшего только исходный процесс очистки по [239], обладает большим гипогликемическим действием через 120 мин после введения, чем через 40 мин (Таб. 27) и, вследствие этого, может применяться в значительно больших дозировках без токсического эффекта для животных.

Таблица 27. Биологическая активность Ins-PSA при внутривенном введении мышам.

Образец	Падение концентрации глюкозы в крови на 40 мин, %	Падение концентрации глюкозы в крови на 120 мин, %
Интактный инсулин человека, 0,08 МЕ*/мл	37	0
Ins-PSA, исходный процесс очистки, 1,2 МЕ/мл	65	40
Ins-PSA полностью очищенный, 1,2 МЕ/мл	42	52
Ins-PSA полностью очищенный, 6 МЕ/мл	65	54
Плацебо-раствор	0	0

* 1 МЕ инсулина во всех случаях – 1/27 часть от 1 мг инсулина

Для получения образцов очищенного конъюгата Ins-PSA большего размера была проведена повторная оптимизация условий проведения синтеза конъюгата, было установлено, что при смешивании цинковой формы инсулина (Zn-Ins) и окисленной полисиаловой кислоты, фракция 14 кДа (PSA) в приблизительно эквимольном соотношении степень конъюгации может быть доведена до 31,5% при проведении реакции в 50% растворе диметилсульфоксида в воде, нагревании реакционной смеси до +37 °С, времени реакции 2 ч, pH реакционной смеси 7,4 и концентрации NaCNBH₃ 4 г/л. Поскольку скорость реакции была пропорциональна концентрации инсулина в растворе, препаративную реакцию проводили при конечной концентрации инсулина 80 г/л, что соответствует его растворимости в смеси ДМСО-вода.

Очистка получаемого таким образом конъюгата при помощи ОФ-ВЭЖХ с последующей анионообменной хроматографией позволяет добиться выхода готового продукта в 54% , то есть 17% от введенного в реакцию конъюгации инсулина. При этом для нескольких полученных партий Ins-PSA содержание свободного инсулина не превышало 1%, содержание конъюгата с малой длиной цепи полисиаловой кислоты не превышало 2%, а содержание двузамещенного конъюгата не превышало 5%.

4.8.2. Конъюгат оксинтомодулина и полисиаловой кислоты

Синтез конъюгата между OXM и окисленной PSA проводили согласно [239] с некоторыми изменениями. Полипептид и PSA смешивали в молярном соотношении 1:3 (что соответствует оптимуму выхода продукта реакции) и инкубировали при температуре +37 °С в присутствии NaCNBH₃. Степень превращения полипептида в конъюгат измеряли методом ОФ-ВЭЖХ. Предполагалось, что при pH=6,0 реакция образования основания Шиффа будет в основном происходить с более нуклеофильным атомом азота на N-конце белка, то есть

имеющим более низкую pK_a , а при pH 7,8 модификация могла в равной мере затрагивать N-концевую аминогруппу и ϵ -аминогруппы двух остатков лизина в составе ОХМ. Неожиданно было обнаружено, что детектируемая по ОФ-ВЭЖХ анализу химическая модификация ОХМ происходит только при $pH=6,0$ (данные не приводятся).

Скорость реакции при $pH=6,0$ была достаточно высокой, концентрация продукта достигала плато после двух часов инкубации, выход конъюгата (в терминах степени конверсии ОХМ) составлял около 50%. Дальнейшая инкубация реакционной смеси приводила к появлению вариантов конъюгата с предположительно укороченными цепями полисиаловой кислоты, что проявлялось как накопление правого плеча у основного пика конъюгата на хроматограмме (Рис. 55).

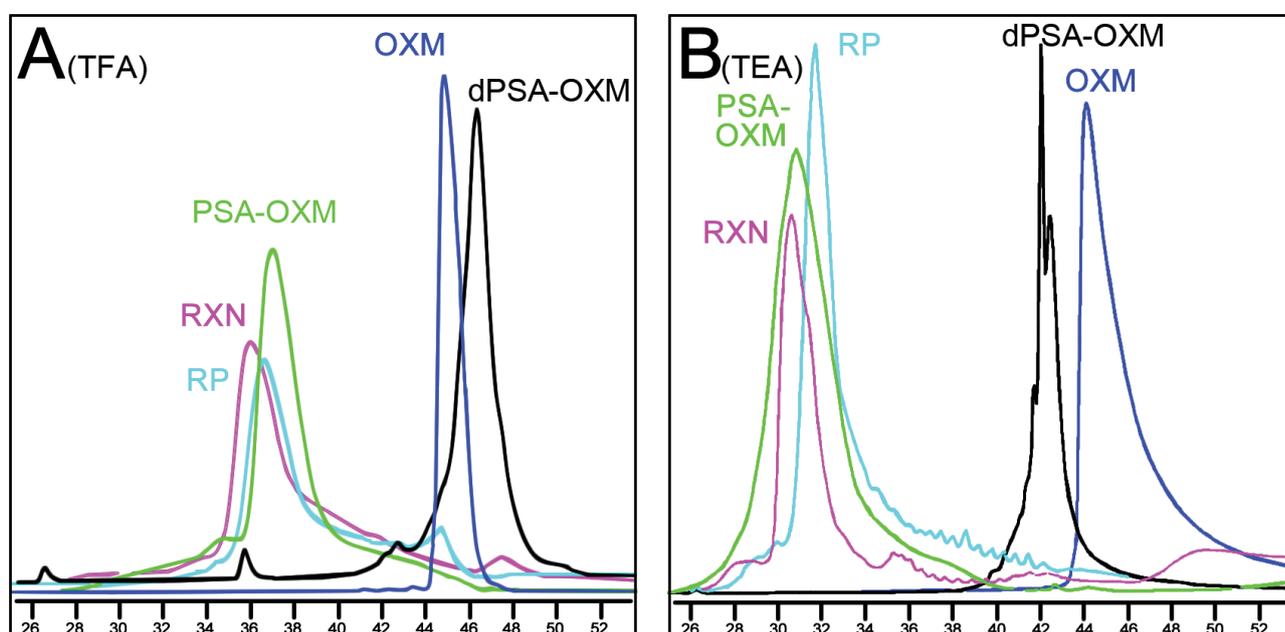


Рисунок 55. Хроматограммы ОФ-ВЭЖХ анализа промежуточных продуктов со стадий очистки PSA-OXM. Синяя линия – интактный ОХМ, малиновая линия (RXN) – продукт синтеза до очистки, голубая линия RP – элюат первой стадии очистки, зеленая линия PSA-OXM – готовый конъюгат, черная линия – дегликозилированный ОХМ. Панель А – хроматография в присутствии 0,1% TFA, панель В – в присутствии 0,05% TEA, программа градиента одинакова для панелей А и В, времена удерживания приведены в минутах.

Аналитическую ОФ-ВЭЖХ проводили в присутствии двух различных ион-парных агентов, TFA и TEA, образующих ионные пары преимущественно с ОХМ и PSA, соответственно.

Продукт синтеза немедленно подвергали двухстадийной хроматографической очистке – ОФ-ВЭЖХ в присутствии этанола и TEA и последующей анионообменной хроматографии с элюцией продукта в градиенте концентрации NaCl. Первая стадия очистки была предназначена для полного удаления свободной PSA и солей и понижения содержания

свободного ОХМ приблизительно на порядок, на второй стадии процесса очистки свободный ОХМ не связывался с сорбентом, а разделение конъюгата проводилось по длине цепи полисиаловой кислоты и фракции, соответствующие укороченным цепям полисиаловой кислоты, удаляли. Собранные целевые фракции конъюгата концентрировали ультрафильтрацией и переводили диафильтрацией в фосфатно-буферизованный раствор для хранения, конечная концентрация PSA-ОХМ составила около 500 мкМ.

Выход процесса очистки составлял около 60%, то есть общий выход относительно взятого в реакцию ОХМ – около 30%. Массовую концентрацию PSA в полученном конъюгате определяли резорциноловым методом, молярное соотношение PSA (со средней молекулярной массой 14,1 кДа) к ОХМ составило около 1:1, таким образом в полученном конъюгате не содержалось существенной примеси молекул с короткими цепями полисиаловой кислоты.

4.8.3 Определение точки конъюгации при помощи пептидного картирования

Для получения сфокусированного пика гликоконъюгированного фрагмента ОХМ при ОФ-ВЭЖХ анализе полисахаридную цепь предварительно гидролизовали обработкой муравьиной кислотой; дегликозилированный полипептид (dОХМ) очищали ультрафильтрацией/диафильтрацией при помощи центрифужного концентратора с мембраной 3 кДа. Методом MALDI-TOF подтвердили, что молекулярная масса dОХМ составляет 4680,3 Да, а молекулярная масса интактного ОХМ – 4449,0 Да, различие в молекулярной массе – 231,3 Да, что хорошо соответствует ожидаемой массе одного присоединенного остатка окисленной нейраминовой кислоты (231.0 Да). Таким образом, было установлено, что ОХМ в составе конъюгата замещен только по 1 сайту из трех возможных.

Позиция модификации ОХМ была установлена путем пептидного картирования. При гидролизе ОХМ протеазой Asp-N, разрезающей полипептидную цепь перед остатками аспарагина, полипептид разделяется на 4 фрагмента H₁-S₈, D₉-L₁₄, D₁₅-Q₂₀ и D₂₁-A₃₇, среди которых фрагмент D₁₅-Q₂₀ не содержит аминокислот с боковыми аминогруппами, а остальные три содержат по 1 потенциально реакционноспособной аминогруппе. Можно отметить, что использованное соотношение протеазы и субстрата приводило к полному гидролизу как интактного ОХМ, так и PSA-ОХМ, то есть одинаковому соотношению объемов пиков обоих совпадающих по времени удерживания пептидных фрагментов, что

указывает на отсутствие существенного экранирования поверхности ОХМ полисахаридной цепью.

Пептидные фрагменты, полученные при гидролизе ОХМ, dОХМ и PSA-ОХМ, были разделены при помощи ОФ-ВЭЖХ, собраны и лиофилизованы для последующего масс-спектрометрического анализа (Рис. 56).

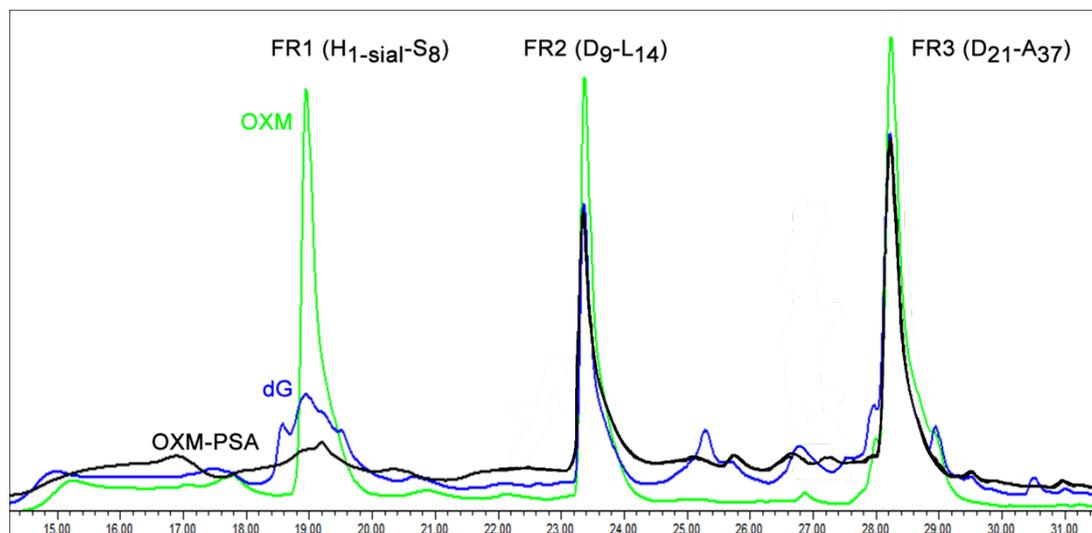


Рисунок 56. Хроматограммы ОФ-ВЭЖХ анализа пептидных фрагментов ОХМ и его производных, полученных гидролизом протеазой Asp-N. Зеленая линия ОХМ – интактный полипептид ОХМ, синяя линия dG – дегликозилированный ОХМ, черная линия ОХМ-PSA – конъюгат. Над пиками обозначены номера фракций и последовательности пептидных фрагментов, найденных масс-спектрометрическим анализом.

Молекулярная масса для фрагментов FR2 и FR3 составила 788,0 Да и 2120,0 Да, что хорошо соответствует теоретически рассчитанным массам для интактных фрагментов D₉-L₁₄ и D₂₁-A₃₇; 787,9 Да и 2120,8 Да. Материал, соответствующий фрагменту FR1, содержал пептид с молекулярной массой 864,3 Да в случае интактного ОХМ; набор молекул с различными молекулярными массами в случае dОХМ с наиболее интенсивным сигналом 1095,4 Да и отсутствие ионизируемых молекул с массой до 14 кДа, в случае PSA-ОХМ. Теоретически рассчитанная молекулярная масса фрагмента H₁-S₈ составляет 864,2 Да, а молекулярная масса этого фрагмента с присоединенным остатком окисленной нейраминовой кислоты (восстановление связи до вторичного амина) - 1095,0 Да, таким образом модификация пептида сахаридом фиксируется именно на фрагменте ОХМ H₁-S₈, содержащем единственную аминокгруппу у остатка H₁, то есть на N-конце пептида. Необходимо отметить, что ни на одной из хроматограмм не был зафиксирован пик, соответствующий пептидному фрагменту D₁₅-Q₂₀, однако данный пептид не содержит

аминокислот с боковой аминогруппой и его модификация альдегидной формой полисиаловой кислоты представляется невозможной.

Параллельно масс-спектрометрическому анализу разделенных хроматографией пептидных фрагментов была проведена масс-спектрометрия для неразделенных гидролизатов OXM, dOXM, PSA-OXM, фрагменты масс-спектров, содержащие пики целевых молекулярных ионов, приведены на (Рис. 57).

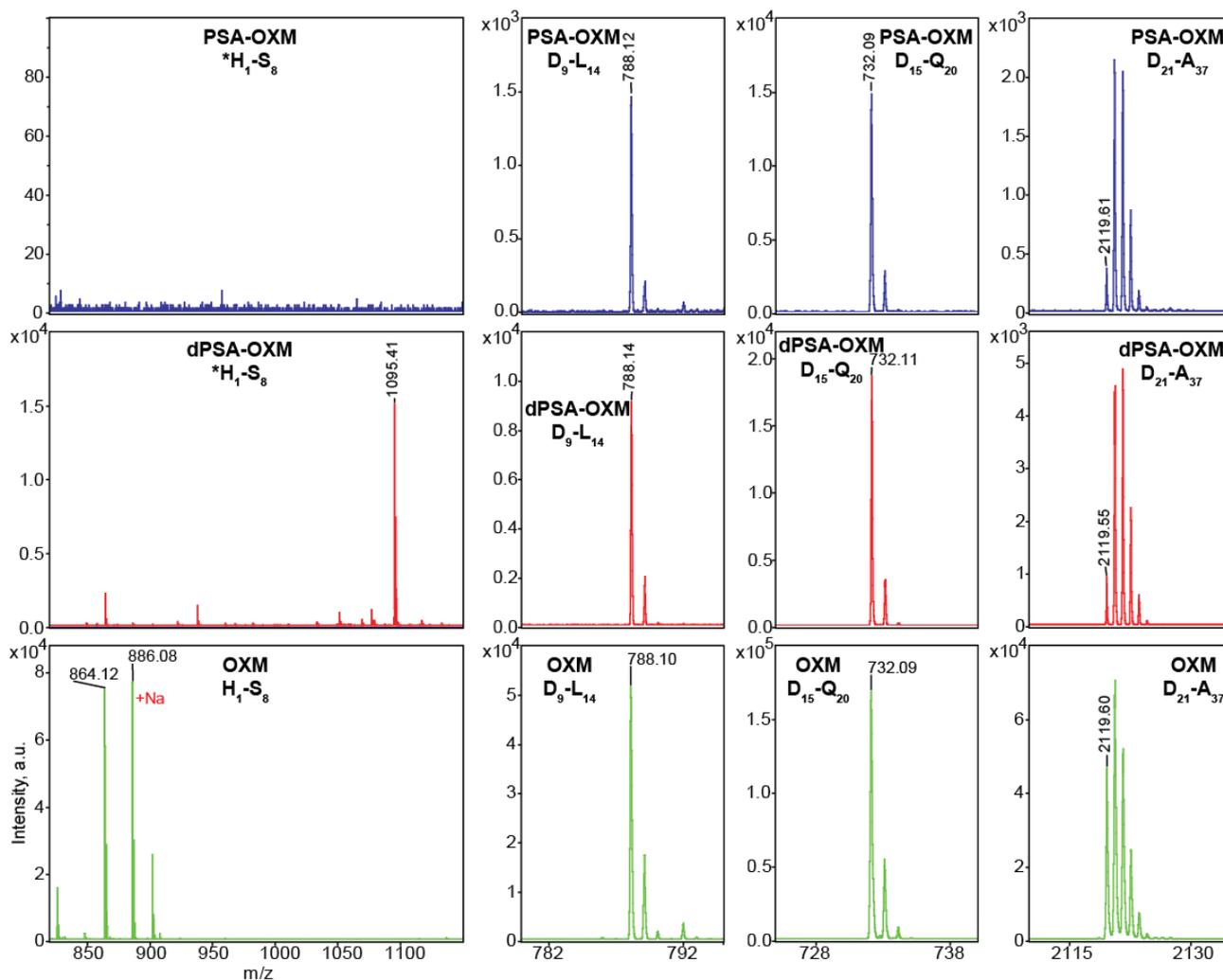


Рисунок 57. Сравнительные масс-спектры гидролизатов протеазой Asp-N интактного OXM (зеленый), дегликозилированного OXM (красный) и PSA-OXM (синий). Молекулярные массы приведены в Да.

Для всех трех образцов были получены одинаковые молекулярные массы, соответствующие фрагментам D₉-L₁₄, D₁₅-Q₂₀ и D₂₁-A₃₇, при этом пик, соответствующий фрагменту H₁-S₈ (864 Да), выявляется только в случае интактного OXM; в случае dOXM наблюдается только сигнал 1095,4 Да, что соответствует присоединению одного остатка

нейраминовой кислоты (231.0 Да), а в случае PSA-OXM сигналы в данном диапазоне масс отсутствуют, то есть свободный фрагмент H₁-S₈ в данном препарате отсутствует.

Таким образом, анализ конъюгата PSA-OXM при помощи пептидного картирования и масс-спектрометрии продемонстрировал, что OXM в составе конъюгата модифицирован полностью и только в одной точке – первом аминокислотном остатке His.

4.8.4. Определение чувствительности к DPP-IV

Определение скорости гидролиза интактного OXM и PSA-OXM вели при помощи ОФ-ВЭЖХ по отношению площади пика основного продукта распада к сумме площадей всех пиков. Для интактного OXM было установлено, что половина субстрата распадается за 20 ч в присутствии 370 мЕД/мл DPP-IV (молярное отношение субстрат:фермент около 60'000:1). В случае конъюгата PSA-OXM продукт деградации не детектировался при таком же времени реакции и концентрации фермента 2,9 ЕД/мл (молярное соотношение около 8000:1). Полученный конъюгат устойчив к действию DPP-IV.

4.8.5. Влияние PSA-OXM на общее потребление пищи в краткосрочном тесте

Принято считать, что анорексигенный эффект инъецированного OXM определяется взаимодействием OXM с рецептором GLP-1 [258] и рецептором GCG [298]. Детальные исследования этих первичных биологических свойств PSA-OXM находятся за рамками настоящего исследования. Мы предположили, что общая сила и продолжительность анорексигенного эффекта конъюгата на модели *in vivo* будет достаточной его характеристикой для последующей разработки прототипов лекарственного средства. В данном исследовании была применена модель острого голодания для нормальных (lean) мышей линии C57BL/6N, данная линия мышей и схема эксперимента достаточно стандартна и используется во многих опубликованных исследованиях биологических свойств OXM и его производных [257, 263, 299]. В качестве вещества сравнения использовали OXM, а в качестве отрицательного контроля – физиологический раствор.

Первоначальное исследование пищевого поведения мышей было проведено для дозировок интактного OXM 0.2 мкмоль/кг и 3 мкмоль/кг и PSA-OXM в дозе 3 мкмоль/кг. Анорексигенный эффект, то есть уменьшение потребления пищи было достоверно ($P < 0,05$) зафиксировано для интактного OXM в дозе 0.2 мкмоль/кг только на 20 мин, а для интактного OXM эффект был выражен до 120 мин с весьма значительным уменьшением потребления пищи на отметках 20 мин и 40 мин (Рис. 58).

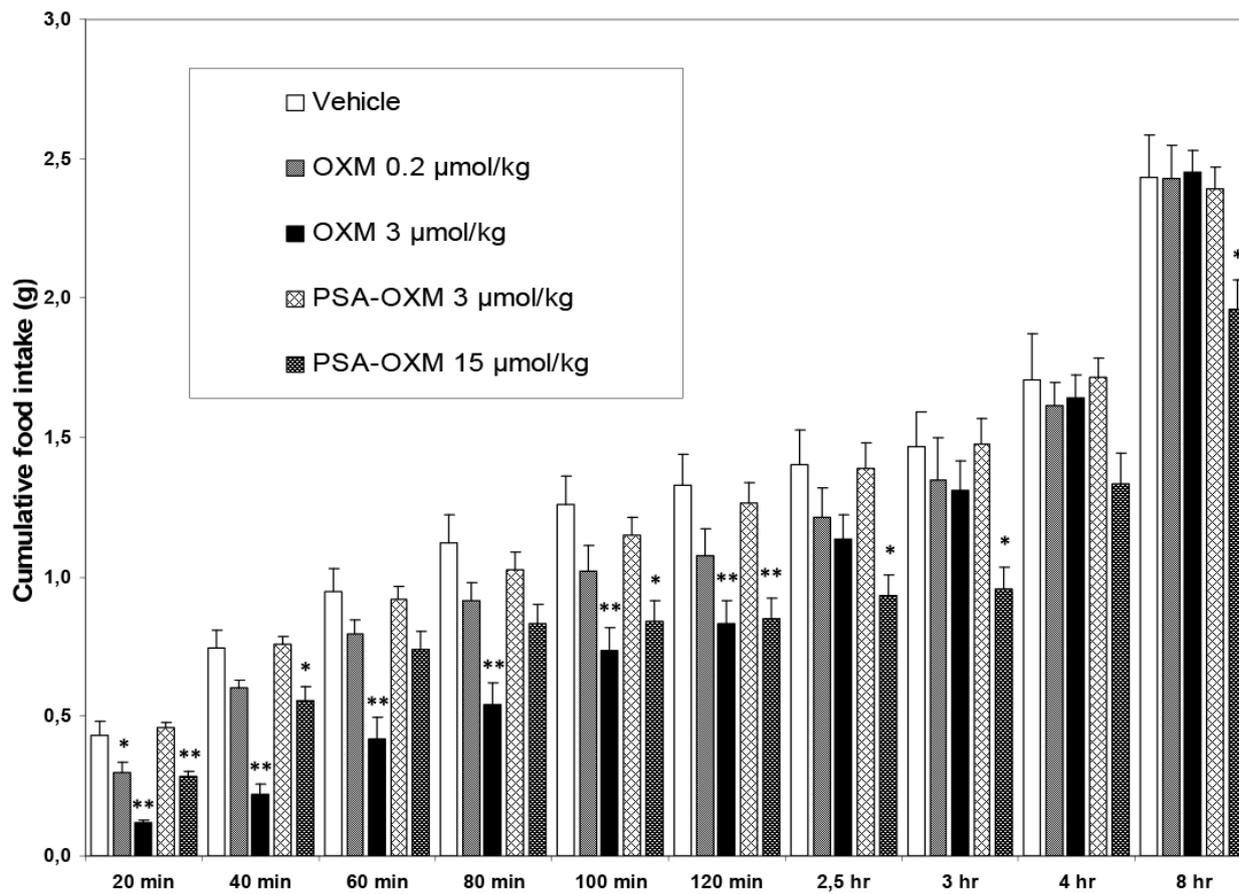


Рисунок 58. Суммарное потребление пищи мышами линии C57Bl6 после однократного в.б. введения физиологического раствора, OXM или PSA-OXM. Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение (n=10-12), * - p<0,05; ** - p<0,01; сравнение с группой, получившей физиологический раствор, двусторонний дисперсионный анализ с последующим post-hoc тестом Даннета .

Чувствительность теста хорошо соответствовала ранее опубликованным данным [263]. Анорексический эффект PSA-OXM, взятого в дозе 3 мкмоль/кг, отсутствовал. Вследствие того, что модификация N-концевой аминокислоты могла существенно уменьшить биоактивность OXM, тест был повторен с увеличенными в 5 раз дозировками OXM и PSA-OXM. В случае интактного OXM в дозировке 15 мкмоль/кг наблюдались видимые изменения в поведении всех мышей (n=10); в период 10-90 мин после введения OXM наблюдали состояние ступора, полидипсии и последующую выраженную полифагию после прекращения ступора. Дисперсия суммарного потребления пищи для данной группы мышей была слишком высока для статистического анализа. В то же время для PSA-OXM в дозировке 15 мкмоль/кг не наблюдалось видимых изменений в поведении животных после инъекции, а потребление пищи было достоверно (P<0,05) снижено в течение 8 ч после инъекции, при этом не наблюдалось пиковой активности OXM через 20-40 мин после

инъекции. Возможный анорексигенный эффект свободной PSA, взятой в дозировке 15 мкмоль/кг, оценивался в отдельном эксперименте (Рис. 59).

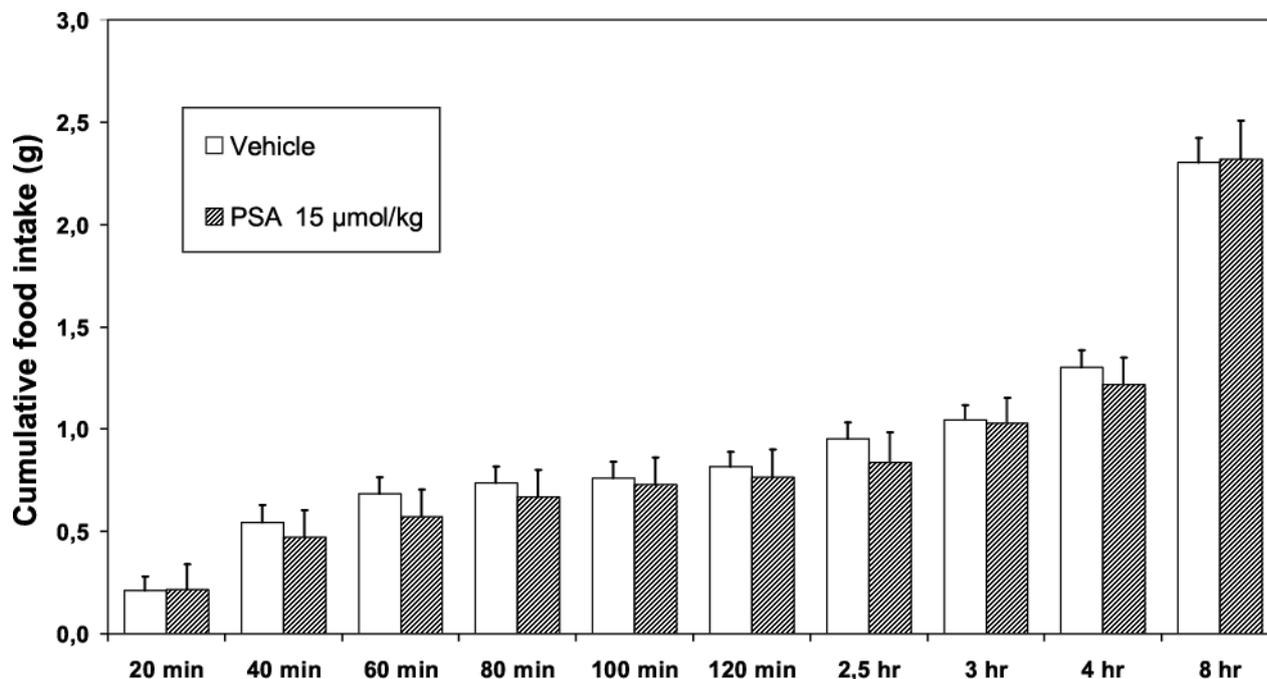


Рисунок 59. Суммарное потребление пищи мышами линии C57Bl6 после однократного в.б. введения физиологического раствора или свободной PSA. Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение (n=12-13), сравнение с группой, получившей физиологический раствор, двусторонний дисперсионный анализ с последующим post-hoc тестом Даннета .

Никаких статистически достоверных различий в потреблении пищи между контрольной группой (инъекция физраствора, n=13) и опытной группой (инъекция PSA, n=12) не было обнаружено, конъюгат PSA-OXM, но не свободная PSA вызывает пролонгированный анорексигенный эффект *in vivo*.

Оксинтомодулин является перспективным пептидом для терапии ожирения, в то же время представляется очевидным, что интактный OXM не может достичь требуемой клинической эффективности, поэтому данный пептид подвергают разнообразным модификациям, которые должны были бы увеличить его стабильность в кровотоке и сделать его более устойчивым к действию специфических протеаз. До проведения настоящего исследования не существовало опубликованных данных о свойствах OXM после конъюгации с любыми гидрофильными полимерами, одновременно с этим, для конъюгатов родственного гормона GLP-1 и линейного полиэтиленгликоля были получены данные о возможности стабилизации с его помощью уровня глюкозы на модели диабета типа 2 у мышей с генотипом db/db [300].

4.9. Механизм взаимодействия каталитических антител с фосфоорганическими субстратами

Для ранее созданного в лаборатории биокатализа ИБХ РАН моноклонального антитела А5, ковалентно связывающего (то есть катализирующего распад) несколько фосфоорганических соединений, был проведен сайт-специфический мутагенез, позволяющий провести для его Fab-фрагмента определение кинетических параметров реакции с субстратами методами предстационарной кинетики. Были созданы мутанты антитела А5 с заменами L-R51W и H-F100W в легкой цепи антитела, при этом были использованы константные области обоих вариантов легкой цепи – каппа и лямбда. Все 4 «триптофановых» мутанта были получены в виде Fab-фрагментов в экспрессионной системе метилотрофных дрожжей *P. Pastoris*. Было установлено, что эффективность их взаимодействия с модельным фосфорорганическим веществом - фосфонатом X (п-нитрофенил 8метил-8-азабицикло[3.2.1]октил фенилфосфонат) сравнима с интактным антителом А5. Методом кинетики в остановленной струе были установлены значительные конформационные изменения в процессе модификации фосфонатом.

Для определения химической специфичности Fab-фрагментов антител А5 и А17, отобранных как наиболее эффективные катализаторы распада фосфоната X, были проведены исследования взаимодействия биокатализаторов с панелью фосфорорганических соединений (таб. 28).

Таблица 28. Химические структуры и значения k_{cat}/k_{uncat} для реакций взаимодействия антител А17 и А5 с фосфорорганическими субстратами.

Название и формула соединения	Значение k_{cat}/k_{uncat} , $\times 10^{-3}$	
	А17	А5
Фосфонат X - п-нитрофенил 8метил-8-азабицикло[3.2.1]октил фенилфосфонат	0.47	0.4
Фосфонат X-AEDANS	0.27	0.22
Параоксон - О,О-диэтил О-(4-нитрофенил) фосфат	0.002	ND
Фосфонат Y-MCA - Этил (4-метил-2-оксо-2Н-хромен-7-ил) 4-(2,2,2-трифторацетиламино)бензил фосфонат	0.003	ND
Soman-MCA - 4-хлоро-2-оксо-2Н-хромен-7-ил (3,3-диметилбутан-2-ил) метилфосфонат	0.005	ND

ND – отношение k_{cat}/k_{uncat} , $\times 10^{-3} < 0.001$, что соответствует ошибке эксперимента.

Было установлено, что антитело А5 обладает исключительной специфичностью к фосфонату X и его флуоресцентному производному X-AEDANS, в то время как активности к параоксону не наблюдается. Исследуемые антитела А5 и А17 не обладают реакционной способностью к таким субстратам, как зоман-MCA или фосфонат Y-MCA.

Известно, что различия в изотипах легких цепей могут существенно влиять на структурно-функциональные характеристики каталитических антител, поэтому исследование проводили для вариантов как с каппа, так и с лямбда константным доменом. В таб. 29 представлены кинетические параметры взаимодействия антител А5 и А17 с фосфонатом X и его флуоресцентным производным X-AEDANS. Для расчета кинетических параметров реакции модификации использовали кинетическую схему Китца–Уилсона, описывающую взаимодействие ковалентных ингибиторов с ферментами.

Таблица 29. Сравнительный анализ кинетических параметров реакции Fab-фрагментов антител А5 и А17 с фосфонатом X и его флуоресцентным производным X-AEDANS в стационарных условиях.

Субстрат	Антитело	$K_{\text{дис}},$ мкМ	$k_2,$ мин ⁻¹	$k_i,$ мин ⁻¹ М ⁻¹
X-AEDANS	A17κ	4.4 ± 0.1	0.1 ± 0.005	23100 ± 1600
	A17λ	15.3 ± 0.3	0.21 ± 0.008	13600 ± 800
	A5κ	5.5 ± 0.1	0.06 ± 0.002	11000 ± 600
	A5λ	16.7 ± 0.4	0.14 ± 0.004	8500 ± 400
X	A17κ	120 ± 15	0.24 ± 0.03	2000 ± 500, [5]
	A17λ	130 ± 15	0.28 ± 0.02	2200 ± 400, [5]
	A5κ	470 ± 13	0.24 ± 0.01	510 ± 20
	A5λ	775 ± 19	0.3 ± 0.01	390 ± 20

$$k_i = k_2/K_{\text{дис}}$$

Анализ результатов стационарной кинетики позволил установить, что каталитическая эффективность взаимодействия антител с лямбда-изотипом несколько меньше, чем для каппа вариантов и основное влияние на эти различия оказывает стадия нековалентного взаимодействия, что может быть связано с различной структурной подвижностью переменных доменов антител с каппа- и лямбда-изотипами легкой цепи.

Поскольку наибольшие различия реакции антитела А5 с фосфонатом X наблюдаются на стадии нековалентного связывания субстрата, были проведены эксперименты по оценке кинетических параметров реакции в предстационарных условиях. Изменение внутренней триптофановой флуоресценции оценивали методом остановленной струи. Ранее данным методом было показано, что реакции взаимодействия антитела А17 с фосфонатом X протекает в две стадии и при этом реализуется механизм индуцированного соответствия. Однако в случае антитела А5 изменений в триптофановой флуоресценции детектировать не удалось, что может быть связано как с реализацией другого, отличного от антитела А17,

механизма нековалентного связывания фосфоната X, так и с отсутствием участия в реакции имеющихся остатков триптофана.

Для проверки мутантов антитела A5 были созданы генетические конструкции, содержащие кодоны триптофана в выбранных позициях. Замены в легкой цепи проводились как с каппа-, так и с лямбда-вариантом константного домена. Как и антитело A5 дикого типа, мутанты A5k_H-F100W, A5λ_H-F100W, A5k_L-R51W и A5λ_L-R51W были получены в дрожжевой системе *P. pastoris*. Сохранение способности триптофановых мутантов к ковалентному взаимодействию с субстратом было установлено по реакции с биотинилированным фосфонатом X (BtX) методом Вестерн-блоттинга. В качестве положительного контроля реакции использовали Fab-фрагмент антитела A5 дикого типа, в качестве отрицательного – Fab-фрагмент неактивного мутанта L-S35E антитела A17. Для триптофановых мутантов антитела A5 были выявлены продукты реакции с подвижностью около 25 кДа, что согласуется с расчётной молекулярной массой легкой цепи.

Кинетические измерения проводили в тех же условиях, как и для антитела A5 дикого типа. Оценка эффективности взаимодействия триптофановых мутантов антитела A5 с фосфонатом X представлена в таб. 30. Как видно из данных стационарной кинетики мутантные антитела в целом сохранили высокий уровень специфической активности. Эксперименты по исследованию изменения триптофановой флуоресценции методом остановленной струи позволили установить, что антитело A5 взаимодействует с фосфонатом X по двухстадийному механизму индуцированного соответствия. Как видно из таб. 31, индивидуальные константы скорости первичного нековалентного связывания фосфоната X с мутантными антителами примерно в два раза ниже по сравнению с антителом A17, скорость второй стадии – подстройки активного центра – ниже в 2-5 раз. Интересно отметить, что в отличие от антитела A17, где скорость второй стадии для лямбда варианта в 1.5 раза ниже, в сравнении с каппа вариантом, скорость второй стадии для антитела A5λ_L-R51W в два раза выше по сравнению с A5k_L-R51W. Для A5_H-F100W скорости второй стадии практически не зависят от изотипа легкой цепи.

Таблица 30. Сравнительный анализ эффективности взаимодействия антитела A5 и его триптофановых мутантов с фосфонатом X.

Антитело	k_i , мин ⁻¹ М ⁻¹
A5к	510 ± 20
A5λ	390 ± 20
A5k_L-R51W	440 ± 30

A5λ_L-R51W	370 ± 80
A5κ_H-F100W	190 ± 10
A5λ_H-F100W	210 ± 10

$$k_i = k_2/K_{\text{дис}}$$

Таблица 31. Сравнительный анализ кинетических параметров реакции мутантных Fab-фрагментов антитела A5 и антитела A17 с фосфонатом X в предстационарных условиях.

Антитело	$k_{\text{наб.1}}, \text{сек}^{-1}$	$k_{\text{наб.2}}, \text{сек}^{-1}$	$K_{\text{дис1}}, \text{мкМ}$	$K_{\text{дис2}}$
A17κ	530 ± 90	130 ± 30	70 ± 10	3.3 ± 0.5
A17λ	580 ± 90	80 ± 20	30 ± 5	1.4 ± 0.3
A5κ_L-R51W	250 ± 50	16 ± 5	240 ± 40	0.4 ± 0.1
A5λ_L-R51W	255 ± 50	30 ± 8	260 ± 30	0.7 ± 0.1
A5κ_H-F100W	200 ± 20	40 ± 5	60 ± 10	3.9 ± 0.5
A5λ_H-F100W	205 ± 40	50 ± 10	55 ± 5	3.3 ± 0.4

Создание биологического антитода на основе антител, способного нейтрализовать фосфорорганические отравляющие токсины (ФОТ) является актуальной прикладной задачей. Необходимость разработки новых биологических антитодов для терапии отравлений ФОТ обусловлена широким применением пестицидов, причем часто без особых мер предосторожности. Современные протекторы и терапевтические агенты, применяемые при отравлении ФОТ, не совершенны, токсичны и вызывают широкий спектр побочных эффектов.

Антитела A5 и A17, полученные с использованием подхода «реактибоди», являются перспективными кандидатами для создания на их основе каталитических антител для терапии отравлений ФОТ. Проведенные эксперименты показали, что эффективность взаимодействия антител A17 и A5 по отношению к фосфонату X незначительно отличаются ($k_i^{A17}/k_i^{A5} = 3.9$ и 5.6 для каппа- и лямбда- вариантов, соответственно), а по отношению к его флуоресцентному аналогу X-AEDANS отличия еще менее значимые.

Анализ окружения нуклеофильного остатка L-Y33 в антителе A5 позволил установить, что единственный остаток триптофана H-W92 активного центра расположен в глубине гидрофобного кармана и, по всей видимости, не участвует во взаимодействии с субстратом. Этот факт может объяснить отсутствие детекции изменения триптофановой флуоресценции в процессе реакции. Нужно отметить, что размеры активных центров антител A5 с каппа- и лямбда- изо типами легкой цепи отличаются, что связано с различной

подвижностью гипервариабельных петель. В случае антитела A5к активный центр уменьшается за счет петли H-CDR3, которая находится в контакте с петлей L-CDR1 и нуклеофильным остатком L-Y33. По всей видимости, этот факт оказывает решающее влияние на изменение скоростей второй стадии нековалентного взаимодействия. Вероятно, замена в 51 положении положительно-заряженной аминокислоты аргинина на ароматический триптофан изменяет профиль взаимодействия остатка с петлей H-CDR3, и таким образом влияет на скорость подстройки активного центра под субстрат. Позиция 100 тяжелой цепи находится с противоположной стороны относительно нуклеофильного остатка и замена в этом положении одной ароматической аминокислоты на другую подобного эффекта не оказывает.

Важно отметить, что согласно полученным в данной работе исследованиям, взаимодействие антитела A5 с фосфонатом X реализуется через механизм индуцированного соответствия и сходно с таковым для антитела A17. Таким образом, антитело A5 можно рассматривать как альтернативу антителу A17 для направленного изменения его функциональной активности. Наличие экспонированного реакционного остатка представляет больше вариантов для создания и проведения широкомасштабного скрининга виртуальных библиотек на основе антитела A5 с использованием технологии квантово-механических расчетов химических реакций.

5. Обсуждение результатов

При получении и исследовании ряда клональных линий клеток-продуцентов фармацевтически значимых белков нами были последовательно рассмотрены возможности получения клеток с максимально высокой удельной продуктивностью и достаточной стабильностью при продолжительном культивировании при помощи различных вариантов создаваемых экспрессионных плазмид. Основной целью этих исследований было создание и характеристика платформенной технологии получения линий-продуцентов для воспроизведенных лекарственных препаратов гликопротеинов различных классов. Поскольку мировые исследования в данной области в основном сосредоточены на решении задач получения воспроизведенных и инновационных лекарственных препаратах рекомбинантных мкАт, то большинство публикуемых специализированных плазмидных векторов и методов их использования наиболее эффективны именно для экспрессии генов иммуноглобулинов и их применимость к белкам других классов остается малоизученной. Вследствие этого, в данной работе исследования были проведены для белков системы гемостаза – витамин К-зависимых факторах свертывания крови VII и IX, неэнзиматическом кофакторе фактор свертывания крови VIII, не обладающим Gla-доменом, а также двух частично родственных друг другу гликопротеидных гормонов – фолликулостимулирующем гормоне и лютеинизирующем гормоне.

В случае фактора свертывания крови VII было проверено предположение о том, что экспрессионные плазмиды на основе промоторов генов домашнего хозяйства клетки, а именно коровой области промотора гена фактора элонгации трансляции 1 альфа (EF1) человека, могут быть более пригодны для получения линий-продуцентов, чем плазмиды с сильными вирусными промоторами. Предположительно, промоторные области генов домашнего хозяйства млекопитающих должны быть менее подвержены сайленсингу метилированием или гетерохроматинизации, в отличие от ксеногенных для клеток-хозяев вирусных промоторов. В случае фVII и плазмиды с коровой областью промотора EF1, тем не менее, нам не удалось обнаружить явного ее преимущества над ранее опубликованными вариантами систем экспрессии фVII – для лучших отобранных клональных линий клеток наблюдалось падение удельной (и общей вольюметрической) продуктивности при продолжительном культивировании и при удалении фетальной сыворотки из культуральной среды. Предположительно, относительно небольшая удельная продуктивность полученных клеточных линий была связана с тем, что при использовании селекционного маркера устойчивости к действию антибиотика зеоцин происходило встраивание малого числа копий плазмиды. Наиболее распространенным способом повышения продуктивности стабильно трансфицированных животных клеток является амплификация интегрированных кассет в геноме под действием возрастающих концентраций

ингибиторов фермента, кодируемого в селекционном маркере плазмиды. Данный процесс представляет собой перестройки в хромосомах клеток, при которых геномный локус (или локусы), содержащие интегрированные в геном плазмиды подвергаются транслокациям и их копияемость многократно увеличивается [301]. Этот процесс обычно занимает значительное время, не менее двух месяцев культивации, и потенциально может приводить к появлению мутаций в области ОРС целевых белков. Большинство селекционных маркеров устойчивости к действию антибиотиков практически нечувствительно к такой амплификации.

Данный метод обычно реализуют для селекционного маркера дигидрофолатредуктазы и ее ингибитора метотрексата [302], значительно реже – для аденозиндеаминазы (ADA, AD) и ее ингибитора 2-деоксикоформицина [303]. Потенциально амплифицируемым маркером считается также глутаминсинтаза (GS) при использовании ингибитора GS метионилсульфоксимицина (MSX) [304], однако, как было установлено в наших исследованиях, скорость амплификации для нее намного ниже, чем для маркера устойчивости DHFR.

Было предположено, что для случаев целевых белков с низкой эффективностью биосинтеза и секреции из культивируемых клеток именно многостадийная геномная амплификация может быть наилучшим методом для получения промышленно пригодных линий-продуцентов. Исходная проверка этого предположения была выполнена на примере фактора свертывания крови VIII, для которого концентрация продукта в культуральной среде около 500 нг/мл уже является приемлемой для организации экономически обоснованного производства биоаналоговых лекарственных средств. Поскольку многостадийная амплификация целевых генов под действием возрастающих концентраций MTX может приводить к разделению целевых генов и гена, кодирующего DHFR, была применена векторная плаزمида рOptiVec, в которой ОРС целевого белка и ОРС DHFR находятся под контролем одного промотора и соединены в бицистронную матрицу при помощи внутреннего сайта связывания рибосом IRES. В данной плазмиде использовался стандартный промотор CMV. В качестве клеток-хозяев была использована сублиния клеток CHO DG44, в которой оба аллеля собственного гена DHFR были повреждены мутагенезом и такая линия клеток считалась неспособной амплифицировать собственный ген DHFR в ответ на добавление MTX. Несколько первых шагов амплификации стабильно трансфицированных клеток действительно привели к многократному возрастанию концентрации секретированного фVIII, однако при повышении концентрации MTX до 1 мкМ наблюдалось резкое падение концентрации целевого белка в культуральной среде. Последующие шаги амплификации не позволили поднять концентрацию фVIII выше значений, зафиксированных для 500 нМ MTX. Для данной системы экспрессии было получено несколько клональных линий-продуцентов с продуктивностью, примерно соответствовавшей известным мировым аналогам и

сохранявших постоянную удельную продуктивность в течение 30 дней последовательного культивирования. Таким образом, было установлено, что стандартные векторные плазмиды, даже имевшие существенные улучшения по сравнению с плазмидами, применявшимися для создания оригинальных лекарственных препаратов фVIII, не позволяют сколько-нибудь существенно увеличить удельную продуктивность клеток.

Было предположено, что такое улучшение удельной продуктивности в случае фVIII может быть достигнуто при отказе от векторных плазмид содержащих только коровые области промоторов, и замене их на клонированный полный ген домашнего хозяйства, в контекст которого были бы встроены ОРС целевых генов и селекционных маркеров.

Ранее группой Аллисона была описана векторная плазида рDEF38 [10], в которой содержались протяженные участки гена фактора элонгации трансляции 1 альфа (EEF1A1) китайского хомячка и окружающая их некодирующая ДНК. Для данной плазмиды была зафиксирован необычно высокий уровень секреции клетками целевых белков в пересчете на одну интегрированную в геном копию плазмиды, а также полное сохранение удельной продуктивности клеток при их культивации в неселективной среде в течение продолжительного периода. Несмотря на то, что в плазмиде рDEF38 был применен селекционный маркер DHFR под контролем промотора SV40, сведения о возможности ее успешной амплификации в геноме клеток не были опубликованы. Данная плазида обладала рядом существенных недостатков – вследствие ее очень большого размера вероятность ее инсерции в хромосомы клеток после трансфекции была весьма низкой, что соответствовало получению малого числа различных клонов стабильно трансфицированных клеток. Вследствие того, что в плазмиде рDEF38 селекционный маркер DHFR контролировался отдельным вирусным промотором, вероятность «расщепления» целевых генов и селекционного маркера DHFR при многостадийной амплификации также представлялась весьма значительной.

Данные особенности плазмиды рDEF38 могли быть устранены путем создания вектора, в котором общий размер плазмиды был бы минимизирован за счет удаления посторонней ДНК, перенесенной из родительских плазмид, предназначенных для манипуляций в *E.coli*, селекционный маркер DHFR был бы перенесен под контроль промотора основного гена, а вероятность интеграции плазмид в геном была бы повышена за счет специализированных последовательностей ДНК.

Такая векторная плазида, названная нами р1.1 была получена путем сборки клонированных фрагментов гена EEF1A1, участка плазмиды рOptiVec, содержащего IRES и ОРС DHFR, конкатемера фрагментов длинного концевого повтора из вируса Эппштейна-

Барр, а также полученной нами ранее плазмиды рВL минимального размера, содержащей только необходимые для культивации в *E.coli* последовательности ДНК. Было обнаружено, что векторная плазида р1.1 действительно способна интегрироваться в геном клеток намного чаще, чем контрольная плазида аналогичной длины, способна к многостадийной амплификации с постоянным ростом уровня экспрессии целевого гена в поликлональной популяции клеток, а стабильно трансфицированные ей клетки сохраняют постоянную удельную продуктивность в течение 60 дней культивирования независимо от уровня экспрессии целевого гена в исследуемых олигоклональных линиях.

Для ко-экспрессии вспомогательных генов или для экспрессии гена второй цепи гетеромультимерных целевых белков были получены векторы р1.2, в которых селекционный маркер DHFR был удален, а вместо него использованы селекционные маркеры устойчивости к антибиотикам различных классов, размещенные вне контекста гена EEF1A1 и находящиеся под контролем промотора SV40. Для данных векторов было обнаружено, что в случае селекционных маркеров устойчивости к зеоцину и гигромицину, но не в случае устойчивости к неомицину практически все стабильно трансфицированные клетки экспрессировали целевой ген, при этом уровень его экспрессии был выше, чем в случае вектора р1.1 (до амплификации, селекция в присутствии 200 нМ МТХ). Созданный набор векторных плазмид был последовательно применен к нескольким различным фармацевтически значимым белкам

Клональные линии-продуценты фVIII с делецией В-домена были получены при помощи вектора р1.1 и четырехстадийной амплификации целевого гена непосредственно в поликлональных популяциях клеток. Для нескольких результирующих клональных линий была зафиксирована удельная продуктивность более 10 мкМЕ/клетка/день, что существенно превосходило известные мировые аналоги и позволило достичь концентрации фVIII около 40 МЕ/мл для простой периодической культуры клеток в перемешиваемых колбах. При добавлении к культуральной среде бутирата натрия в низкой концентрации и антиоксиданта ВНА титр фVIII был увеличен до 100 МЕ/мл, что соответствует сохранению чувствительного к действию бутирата натрия транскрипционного сайленсера в использованной нами природной ОРС фVIII[80]. Одним из возможных объяснений полученного необычно высокого титра секретируемого фVIII можно считать практически полное отсутствие обратного захвата фVIII из культуральной среды на внешнюю мембрану клеток. В ряде работ доля фVIII с делецией В-домена, реадсорбировавшегося на мембрану описывалась как 75%-90% от всего внеклеточного целевого белка [32, 74], в случае полученной в данной работе клеточной линии 11A4H эта доля не превышала 15%.

Вследствие того, что титр фVIII в клеточной линии 11A4H был значительно выше, чем в работе [74], низкая доля связанного с мембраной фVIII могла соответствовать примерно такому же количеству белка, насыщающему возможные сайты связывания на мембране клеток. Данное предположение было проверено при помощи добавления к культуральной среде 10% фетальной сыворотки быка, содержащей заведомый избыток фактора фон Виллебранда – внеклеточного шаперона фVIII, плотно связывающего его в кровотоке до момента активации. В присутствии сыворотки концентрация фVIII в культуральной среде изменилась только на 60%, что может быть объяснено скорее защитой фVIII от протеолитической деградации, чем его перераспределением с мембраны клеток в комплекс с шапероном. Другим агентом, позволяющим блокировать адсорбцию фVIII на мембрану клеток, является фосфо-L-серин, растворимый аналог кислого фосфолипида фосфатидилсерина [92]. В случае линии клеток 11A4H добавление фосфо-L-серина не оказывало никакого воздействия на наблюдаемую удельную продуктивность клеток, таким образом, можно предположить, что основной причиной отсутствия нежелательного захвата целевого белка мембраной клеток можно считать низкий уровень кислого фосфатидилсерина на внешней стороне мембраны клеток линии 11A4H.

Для секретируемого клетками линии 11A4H фVIII с делецией В-домена был разработана методика очистки целевого белка до фармакопейного показателя удельной прокоагуляционной активности, при этом выход готового продукта составил 24%, что позволяет считать разработанный процесс культивирования клеток и очистки продукта промышленно применимым.

Дальнейшую проверку свойств вектора p1.1 и его производных векторов p1.2 проводили на примере фактора свертывания крови IX – типичной модельной системе экспрессии одного целевого гена и 1-2 вспомогательных генов в клетках CHO. Векторные плазмиды p1.2-Zeo и p1.2-Nugro были использованы для ко-экспрессии генов растворимого укороченного варианта сигнальной протеазы PACE/furin человека и эндогенной витамин-К-оксидоредуктазы (VKORC1) китайского хомячка, соответственно. Фурин человека необходим для эффективного процессинга пропептида фIX, а VKORC1 – для увеличения уровня конверсии остатков Glu в остатки гамма-карбоксиглутаминовой кислоты в составе Gla-домена фIX.

Получение стартовой линии-продуцента фIX проводили методом клонирования клеток из исходной популяции стабильно трансфицированных клеток, последующей амплификации отобранной клональной линии с максимальной удельной продуктивностью и повторного клонирования. Такой порядок действий позволил увеличить удельную продуктивность с приблизительно 0,8 пг/клетка/день до 10,7 пг/клетка/день, что всего лишь в 1,8 раза превышает соотношения стартовой и финишной продуктивности для клеток-продуцентов

фVIII (увеличение в 7,3 раза от стартовой популяции до финальной клональной линии), но требует значительно больших временных затрат. По-видимому, плаزمида p1.1 успешно амплифицируется в большинстве стабильно трансфицированных клеток и промежуточное клонирование не позволяет выделить клоны клеток с существенно повышенной скоростью амплификации интегрированных плазмид.

Ко-трансфекция вспомогательных плазмид в промежуточную клональную линию-продуцент фIX и финальное клонирование не изменили ее удельную продуктивность, измеренную методом ИФА, сколько-нибудь существенным образом. Удельная биологическая активность фIX, измеряемая как соотношение прокоагуляционной активности и концентрации фIX по ИФА (все в сравнении с одним стандартом фIX), возросла от 1,8% до 70-100%. Одновременно с этим, для нескольких проанализированных финальных клональных линий клеток наблюдались различные удельные продуктивности по данным коагулометрии, что указывает на различия в уровне активности VKORC1, необходимой для формирования Gla-домена фIX. Уровень отщепления пропептида от секретированного фIX, измеренный по ИФА, во всех случаях превышал 95%, таким образом, для всех проанализированных линий клеток концентрация растворимого фурина была достаточной для полного процессинга пропептида фIX и возможные различия в концентрации фурина не могут быть причиной различий прокоагуляционной активности секретированного продукта в разных клональных линиях клеток.

В данной работе был впервые использован эндогенный для клеток CHO ортолог VKORC1 китайского хомячка вместо VKORC1 человека. Было продемонстрировано, что его прямая ферментативная активность в микросомальной фракции трансфицированных клеток по крайней мере вдвое выше при одинаковой копийности интегрированных в геном плазмид с генами VKORC1. Различные варианты VKORC1 млекопитающих достаточно гомологичны друг другу, однако содержат ряд отличий, в частности, VKORC1 китайского хомячка, но не VKORC1 мыши, крысы или человека, содержит мотив RRR на границе первого трансмембранного домена [305]. Можно предположить, что оверэкспрессия эндогенного VKORC1 китайского хомячка вместо оверэкспрессии VKORC1 человека позволяет увеличить каталитическую эффективность полного витамин К-оксиредуктазного комплекса, однако конкретные механизмы взаимодействия VKORC1 с цитоплазматическими белками – донорами электронов к настоящему моменту еще не описаны.

Секретируемый клетками линии 3B12-86 фактор свертывания крови IX человека был получен методом простого периодического культивирования в концентрации 6 МЕ/мл (около 80 мг/л по ИФА) и очищен до фармакопейных показателей с общим выходом

продукта 32%, что, как и в случае системы экспрессии фVIII, позволяет считать данный способ получения биоаналогового фIX промышленно применимым. Следует отметить, что полученные Р. Кауфманом и соавторами линии-продуценты фIX [106, 117], примененные после доработок для производства оригинального лекарственного препарата фIX Бенефикс, отличалась весьма высокой продуктивностью, значительно превосходившей все опубликованные аналоги, полученные другими исследовательскими группами позднее – до 188 мг/л общего фIX по данным ИФА. Доля корректно процессированного фIX в описанных в работе [106] линиях клеток, тем не менее, была достаточно низкой – от 0,2 до 4,4% от общего фIX. Ко-трансфекция данных клеточных линий плазмидой с геном фурина человека увеличивала долю корректно процессированного фIX в 2-3 раза [134], таким образом, результирующая продуктивность клеточных линий по биологически активному фIX, полученных в работах Р. Кауфмана и соавторов, может быть оценена как не превышающая 22 мг/л.

Разработанная в данной работе система экспрессии фIX превышает данный показатель приблизительно в 4 раза, по-видимому, за счет увеличенной активности витамин К-оксиредуктазного комплекса клеток. Таким образом, вектор p1.1 и его производные могут быть использованы для высококопийной интеграции целевого гена и последующей интеграции небольшого числа копий вспомогательных генов без потери удельной продуктивности клеток по целевому белку. Такая задача является довольно типичной при получении в культивируемых клетках рекомбинантных белков с необычными пост-трансляционными модификациями.

Поскольку комбинация векторных плазмид p1.1 и p1.2 позволила успешно экспрессировать ген целевого белка и два вспомогательных гена, была исследована возможность ее применения для гетеродимерного гликопротеина. Наиболее распространенный метод получения таких продуцентов состоит в размещении одной ОРС в плазмиде с амплифицируемым маркером устойчивости DHFR, а второй ОРС – в плазмиде с маркером устойчивости к неомицину или G418. Данными плазмидами в двух комбинациях ко-трансфицируют клетки СНО и ведут геномную амплификацию одной из конструкций в предположении, что для некоторых клонов клеток будет происходить событие ко-амплификации двух плазмид, встроившихся в один геномный локус.

Мы предположили, что более продуктивной схемой для экспрессии пары генов цепей гетеродимерного белка могло бы стать использование трицистронной матрицы, в которой оба целевых гена и ген DHFR находятся под контролем одного промотора и соединены при

помощи IRES. Данный подход был исследован на примере фолликулостимулирующего гормона человека.

Принято считать, что амплифицируемый маркер устойчивости DHFR значительно более эффективен при использовании клеток CHO DG44 и DUXB11, содержащих 2 или 1 инактивированных аллеля гена *dhfr*, чем при использовании интактных клеток CHO вследствие того, что в интактных клетках при проведении геномной амплификации под действием MTX будет наблюдаться конкурентная амплификация целевых генетических конструкций и собственного гена *dhfr* клеток. При трансфекции трицистронной плазмиды p1.1-FSH-AIB, содержащей OPC обеих цепей ФСГ, было достаточно неожиданно обнаружено, что уровень секреции ФСГ значительно выше в стартовых стабильно трансфицированных популяциях клеток CHO S, чем в популяциях клеток CHO DG44. Три последовательных шага геномной амплификации позволили увеличить уровень секреции ФСГ клетками CHO S только в два раза, однако результирующая популяция обладала весьма высокой удельной продуктивностью – 10 пг/клетка за 3 дня культивации (около 5 пг/клетка/день).

Согласно данным иммуноблоттинга, общий уровень биосинтеза альфа-цепи ФСГ, кодируемой первым цистроном трицистронной матрицы, значительно превосходил уровень биосинтеза бета-цепи. В культуральной среде наблюдалось накопление смеси гетеродимерного ФСГ и свободной альфа-цепи ФСГ, что является достаточно типичным явлением при ко-экспрессии двух неродственных друг другу генов в культивируемых клетках животных. Клетки из поликлональной популяции были трансфицированы плазмидой p1.2-Hygro-FSH-B-chain, что позволило немедленно увеличить их удельную продуктивность до 23,5 пг/клетку (около 12 пг/клетка/день) и отобрать среди финальных клональных линий-продуцентов линию G4, секретировавшую очень небольшие количества свободной альфа-цепи и обладавшей удельной продуктивностью 12,3 пг/клетка/день.

Достигнутый в данной работе уровень удельной продуктивности сильно превосходит известные ранее показатели. Типичные уровни удельной продуктивности, сообщавшиеся для ФСГ, находятся в диапазоне 0,5-1,5 пг/клетка/день [224]. Для клональной линии CHO секретирующей «highly expressed» ФСГ и предположительно используемой для производства биоаналогового ФСГ в Республике Корея, сообщалась удельная продуктивность около 0,3 пг/клетка/день [225]. Можно предположить, что фиксировавшиеся ранее относительно низкие уровни секреции были связаны в основном со слабо сбалансированным уровнем биосинтеза цепей ФСГ, однако даже для примененной в данной работе трицистронной плазмиды удельная продуктивность клеток была уже значительно

выше, чем в других работах. По-видимому, использование плазмид с полными последовательностями некодирующей части гена EEF1A1 в случае экспрессии генов цепей гликопротеидных гонадотропных гормонов позволяет существенно улучшить удельную продуктивность клеток по сравнению со стандартными плазмидами с промотором CMV.

Для отобранной клональной линии клеток G4 был разработан процесс простого периодического культивирования в биореакторе волнового типа с конечной концентрацией продукта 20-25 мг/л и создана схема очистки ФСГ до фармакопейных показателей с выходом около 40%, позволяющая проводить все даунстрим операции при помощи стаканчиковой центрифуги и одной настольной хроматографической установки, а также полностью отказаться от использования установок для ультрафильтрации/диафильтрации. Такие параметры процесса получения субстанции лекарственного препарата ФСГ позволили, в свою очередь, организовать его производство в Российской Федерации при относительно небольших капитальных и временных затратах.

Для секретируемой линией клеток G4 ФСГ была проведена его полная характеристика многими физико-химическими и биологическими методами, ни в одном из тестов не были обнаружены значимые отличия исследуемого биоаналогового ФСГ и оригинального препарата ФСГ Гонал-ф, что свидетельствует о том, что достигнутый высокий уровень удельной продуктивности клеток не влияет значимым образом на пост-трансляционный процессинг целевого белка. Проведенные доклинические и клинические испытания описанного в настоящей работе ФСГ также не выявили статистически значимых отличий исследуемого вещества от препарата сравнения Гонал-ф. Таким образом, секретируемый клетками G4 ФСГ продемонстрировал полную взаимозаменяемость с оригинальным препаратом ФСГ и не имеет никаких выявляемых отличий от оригинального препарата.

Вследствие того, что при расположении областей ОРС цепей гетеродимерного белка в составе одного искусственного оперона и их соединении при помощи IRES наблюдалась преимущественная секреция клетками свободной альфа-цепи ФСГ (первый цистрон), было предположено, что секреция клетками только гетеродимерного белка будет возможна при ко-трансфекции клеток СНО парой плазмид на основе вектора p1.1, одна из которых кодирует цепь гетеродимерного белка и селекционный маркер DHFR, а вторая – другую цепь целевого белка и потенциально амплифицируемый селекционный маркер глутаминсинтетазу (GS). Амплификация генетических конструкций в геноме клеток может, соответственно, вестись при одновременном увеличении концентраций двух селекционных агентов – МТХ и ингибитора GS метионилсульфоксимины (MSX). Данное предположение было проверено на

примере лютеинизирующего гормона, в котором альфа-цепь совпадает с альфа-цепью ФСГ, а бета-цепь неродственна бета-цепи ФСГ.

Было установлено, что ко-трансфекция таких плазмид и последующая их амплификация в геноме клеток-продуцентов под действием метотрексата позволяет многократно увеличить уровень биосинтеза обеих субъединиц ЛГ, а увеличение концентрации ингибитора GS метионилсульфоксимида не влияет на копийность интегрированной плазмиды с маркером устойчивости GS. Тем не менее, удельная продуктивность полученных линий и популяций клеток, секретирующих ЛГ, была значительно ниже, чем удельная продуктивность полученного нами ранее клонального продуцента ФСГ. Для 6 промежуточных клональных линий клеток-продуцентов ЛГ была также проведена геномная амплификация под действие возрастающих концентраций МТХ, однако увеличение продуктивности было зафиксировано только для одной линии клеток. Можно предположить, что в случае плазмиды p1.1 и ее производных вероятность успешной ко-амплификации пары одновременно трансфицированных плазмид остается недостаточно высокой для практического применения. Генетические конструкции с полицистронными матрицами остаются предпочтительным вариантом для получения промышленно пригодных продуцентов гетеродимерных белков.

Второй общий метод получения гликопротеинов, рассматриваемый в настоящей работе – это химическая конъюгация природного полисахарида полисиаловой кислоты (PSA) и полипептидов. Данный метод был рассмотрен на примере инсулина и оксинтомодулина человека.

В случае инсулина человека, конъюгат которого был впервые получен проф. Грегориадисом и сотрудниками [239], в данной работе были пересмотрены процессы синтеза и очистки продукта, позволившие получить полностью гомогенный конъюгат, не вызывающий токсических эффектов у мышей при введении в высоких дозировках.

Процесс конъюгации полисиаловой кислоты и оксинтомодулина человека был разработан в данной работе по аналогии с процессом конъюгации инсулина и полисиаловой кислоты. Было продемонстрировано, что конъюгация альдегидной формы полисиаловой кислоты, реагирующей с аминокетонами, и ОХМ, привела к модификации ОХМ только по N-концевой аминокетонной группе. Оба остатка лизина в составе ОХМ не принимали участия в реакции даже при повышенном pH, что хорошо согласуется с результатами модификации GLP-1 альдегидным производным полиэтиленгликоля [266]. Полностью гомогенный PSA-ОХМ был получен при помощи двух стадий хроматографической очистки – обращеннофазовой и анионообменной хроматографии, при этом вторая стадия очистки

позволила удалить из конъюгата варианты молекулы с короткой цепью PSA, предположительно возникающие из-за длительной экспозиции полисахарида сильному восстановительному агенту - NaCNBH_3 в слабокислых условиях среды. Полученный конъюгат был устойчив к действию специфической протеазы DPP-IV, таким образом оба пути элиминации ОХМ из системной циркуляции были заблокированы, специфический гидролиз остановлен модификацией N-конца полипептида, а почечный клиренс замедлен за счет присоединения к ОХМ длинной полисахаридной цепи.

Удельная активность ОХМ в составе конъюгата, определенная как кратковременное уменьшение потребления пищи животными, была существенно уменьшена по сравнению с интактным ОХМ, наиболее вероятной причиной этого события является стерическая блокировка N-концевой области ОХМ присоединенной к нему полисахаридной цепью. Известно, что замена N-концевого остатка His в молекуле ОХМ на его D-изомер уменьшает связывание с рецептором GLP-1 примерно в 30 раз, а ацетилирование N-концевого остатка His полностью блокирует взаимодействие ОХМ с рецептором GLP-1 [263]. В отличие от ацетилирования, превращение N-концевой первичной аминогруппы остатка His во вторичный амин не влияет непосредственно на состояние имидазольного кольца His.

Единственная инъекция PSA-ОХМ в дозе 15 мкмоль/кг мышам оказалась достаточной для 8-часового постоянного снижения потребления пищи, при этом ни ОХМ, ни свободная PSA в такой же молярной дозировке не могли обеспечить данного биологического эффекта. Такая продолжительность анорексического эффекта сравнима с продолжительностью действия других производных ОХМ пролонгированного действия, описанных в [265, 299], но дозировка ОХМ в нашем случае была значительно выше, чем для других вариантов. Предположительно, удельная биологическая активность ОХМ в составе конъюгата с PSA может быть восстановлена при переносе точки конъюгации полисахарида на внутренние остатки ОХМ, не контактирующие с рецепторами GLP-1 и GCG, либо на C-конец полипептида. Такой модификации может быть подвергнут не только интактный ОХМ, но и его производные, защищенные от воздействия протеазы DPP-IV или химерные пептиды ОХМ – exendin-4.

Таким образом, нами было продемонстрировано, что селективная конъюгация PSA к N-концу полипептидов позволяет получать их производные с существенно пролонгированным периодом действия при частичном сохранении их биологической активности. Вследствие того, что обычно полипептиды и небольшие негликозилированные белки для клинического применения получают при помощи бактерий *E.coli*, затраты на их изготовление весьма низки (типичное значение - \$3 за 1 мг) и составляют очень незначительную долю в стоимости

готового лекарственного средства. Обнаруженное уменьшение удельной биологической активности инсулина и оксинтомодулина при их конъюгации потребует увеличения количества полипептида в разовой доле лекарственного средства приблизительно в 10 раз, однако при меньшей частоте введения полученных препаратов увеличение расхода полипептидов на одного пациента может быть оценено как трехкратное, что предположительно не изменит экономические показатели производителя таких лекарств сколько-нибудь существенным образом.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе последовательно рассмотрены способы получения высокопродуктивных линий-продуцентов медицински значимых гликопротеинов. Было установлено, что существенное увеличение удельной продуктивности клеток по сравнению с существующим мировым уровнем может быть достигнуто путем создания оригинальных векторных плазмид на основе некодирующих участков гена фактора элонгации трансляции 1 альфа (*EEF1A1*) китайского хомячка и фрагмента конкатемера длинного концевой повтора из вируса Эпштейна-Барр. Для данного типа экспрессионного вектора было обнаружено, что он позволяет проводить многостадийную амплификацию генетических кассет в геноме клеток-продуцентов и получать высокопродуктивные клональные клеточные линии при анализе относительно небольшого (несколько сотен) числа клонов. Созданные векторные плазмиды позволяют получать высокопродуктивные клональные линии-продуценты как при трансфекции одной генетической конструкцией с бицистронной или трицистронной матрицей, так и в ситуациях ко-трансфекций культивируемых клеток парами плазмид с различными селекционными маркерами и последовательных трансфекций нескольких плазмид.

Для кандидатных линий-продуцентов нескольких медицински значимых гликопротеинов было продемонстрировано, что высокая удельная продуктивность клеток сохраняется практически постоянной в течение 2-3 месяцев последовательного культивирования, что позволяет использовать данные клеточные линии в промышленном производстве соответствующих биоаналоговых лекарственных средств. Для полученных в ходе выполнения работы линий-продуцентов факторов свертывания крови VII, IX и ФСГ было проведено получение опытно-промышленных серий целевых белков, доклинические и клинические исследования, продемонстрировавшие безопасность и надлежащую биологическую активность продуктов.

Для случаев полипептидных гормонов инсулина и окситомодулина в настоящей работе были разработаны способы их конъюгации с полисиаловой кислотой и очистки продуктов, позволяющие полностью удалить примеси не конъюгированных полипептидов и корректно исследовать биологическую активность получаемых конъюгатов на животных моделях. Для конъюгата окситомодулина с полисиаловой кислотой было впервые продемонстрировано, что он, в отличие от интактного окситомодулина, сохраняет анорексигенную активность в течение нескольких часов после единственной инъекции на модели голодания мышей. Для случая ковалентно связывающих антиген антител A5 и A17

было продемонстрировано, что их механизм реакции с фосфоорганическими веществами может быть описан как индуцированное соответствие.

Созданные в ходе настоящей работы плазмидные векторы семейства p1.1 и исследованные методы их применения могут быть использованы для получения высокопродуктивных клеточных линий, секретирующих фармацевтически значимые белки.

ВЫВОДЫ

1. Разработана модификация векторных плазмид для сверхэкспрессии гетерологичных генов в культивируемых клетках яичника китайского хомячка. Показано, что векторная плазида, включающая некодирующие последовательности ДНК из области гена фактора элонгации трансляции 1 альфа (EEF1A1) китайского хомячка и фрагмент конкатемера длинного концевого повтора вируса Эпштейна-Барр (EBV-TR) интегрируется в геном клеток CHO с существенно повышенной вероятностью и позволяет эффективно экспрессировать гены целевых белков.
2. На примере линии-продуцента фактора VIII свертывания крови человека показано, что уровень секреции нестабильных гликопротеинов большого размера может быть многократно увеличен при использовании специализированного плазмидного вектора и многоступенчатой амплификации генетических кассет в геноме продуцентов.
3. На примере линии-продуцента фактора IX продемонстрировано, что разработанные плазмидные векторы могут быть успешно применены для последовательных трансфекций целевого гена и вспомогательных генов.
4. На примере фолликулостимулирующего гормона человека показано, что использование трицистронной матрицы, в которой открытые рамки считывания двух субъединиц гетеродимерного целевого белка соединены при помощи внутреннего сайта связывания рибосом вируса энцефаломиокардита (EMCV IRES), позволяет получить линии-продуценты гликопротеинов с исключительно высокой удельной продуктивностью и способностью секретировать преимущественно гетеродимерный целевой белок.
5. На примере лютеинизирующего гормона человека установлено, что разработанные векторные плазмиды позволяют вести ко-амплификацию пары целевых генов, один из которых связан с амплифицируемым маркером устойчивости, а второй – с неамплифицируемым маркером.
6. На примере окситомодулина и инсулина человека разработаны принципы создания рекомбинантных белков – прототипов лекарственных средств пролонгированного действия методом направленной конъюгации биополимерной молекулы полисиаловой кислоты.
7. Установлено, что каталитические антитела A5 и A17 образуют с фосфоорганическим веществом фосфонат X ковалентное соединение, при этом механизм реакции может быть описан как индуцированное соответствие.

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018 // *Nat Biotechnol.* – 2018. – Т. 36, № 12. – С. 1136-1145.
2. Gameiro D. N. Top 10 Best-selling Biologicals of 2015 // *LABIOTECH.eu.* – 2015.
3. Rader R. A. Expression Systems for Process and Product Development: A Perspective on Opportunities for Innovator and Follow-on Product Developers // *BioProcess International.* – 2008. – Т. 6, № 6, suppl. 4 Success Stories in Protein Expression. – С. 4-9.
4. Ferrer-Miralles N., Domingo-Espin J., Corchero J. L., Vazquez E., Villaverde A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals // *Microb Cell Fact.* – 2009. – Т. 8. – С. 17.
5. Kaufman R. J., Wasley L. C., Spiliotes A. J., Gossels S. D., Latt S. A., Larsen G. R., Kay R. M. Coamplification and coexpression of human tissue-type plasminogen activator and murine dihydrofolate reductase sequences in Chinese hamster ovary cells // *Mol Cell Biol.* – 1985. – Т. 5, № 7. – С. 1750-9.
6. Urlaub G., Chasin L. A. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1980. – Т. 77, № 7. – С. 4216-20.
7. Derouazi M., Martinet D., Besuchet Schmutz N., Flaction R., Wicht M., Bertschinger M., Hacker D. L., Beckmann J. S., Wurm F. M. Genetic characterization of CHO production host DG44 and derivative recombinant cell lines // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2006. – Т. 340, № 4. – С. 1069-77.
8. Brooks A. R., Harkins R. N., Wang P., Qian H. S., Liu P., Rubanyi G. M. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle // *J Gene Med.* – 2004. – Т. 6, № 4. – С. 395-404.
9. Kim M., O'Callaghan P. M., Droms K. A., James D. C. A mechanistic understanding of production instability in CHO cell lines expressing recombinant monoclonal antibodies // *Biotechnology and Bioengineering.* – 2011. – Т. 108, № 10. – С. 2434-2446.
10. Running Deer J., Allison D. S. High-level expression of proteins in mammalian cells using transcription regulatory sequences from the Chinese hamster EF-1alpha gene // *Biotechnol Prog.* – 2004. – Т. 20, № 3. – С. 880-9.
11. Doronina V. A., Wu C., de Felipe P., Sachs M. S., Ryan M. D., Brown J. D. Site-specific release of nascent chains from ribosomes at a sense codon // *Mol Cell Biol.* – 2008. – Т. 28, № 13. – С. 4227-39.
12. Lucas B. K., Giere L. M., DeMarco R. A., Shen A., Chisholm V., Crowley C. W. High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector // *Nucleic Acids Res.* – 1996. – Т. 24, № 9. – С. 1774-9.

13. Parks G. D., Duke G. M., Palmenberg A. C. Encephalomyocarditis virus 3C protease: efficient cell-free expression from clones which link viral 5' noncoding sequences to the P3 region // *J Virol.* – 1986. – T. 60, № 2. – C. 376-84.
14. Kreiss P., Cameron B., Rangara R., Mailhe P., Aguerre-Charriol O., Airiau M., Scherman D., Crouzet J., Pitard B. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – T. 27, № 19. – C. 3792-8.
15. Cho M. S., Chan S. Y. Vectors having terminal repeat sequence of Epstein-Barr virus // *Book Vectors having terminal repeat sequence of Epstein-Barr virus / Editor.* – U.S.: Bayer Corporation (Pittsburgh, PA) 2001.
16. Cho M. S., Tran V. M. A concatenated form of Epstein-Barr viral DNA in lymphoblastoid cell lines induced by transfection with BZLF1 // *Virology.* – 1993. – T. 194, № 2. – C. 838-42.
17. Cho M. S., Yee H., Brown C., Jeang K. T., Chan S. An oriP expression vector containing the HIV-1 Tat/TAR transactivation axis produces high levels of protein expression in mammalian cells // *Cytotechnology.* – 2001. – T. 37, № 1. – C. 23-30.
18. *Bioprozesstechnik.* / Chmiel H.: Spektrum Akademischer Verlag, 2011.
19. Antonarakis S. E., Kazazian H. H., Tuddenham E. G. Molecular etiology of factor VIII deficiency in hemophilia A // *Hum Mutat.* – 1995. – T. 5, № 1. – C. 1-22.
20. Kemball-Cook G. Haemophilia A Mutation Database // *Book Haemophilia A Mutation Database / Editor* University College London, 1994.
21. Payne A. B., Miller C. H., Kelly F. M., Michael Soucie J., Craig Hooper W. The CDC Hemophilia A Mutation Project (CHAMP) mutation list: a new online resource // *Hum Mutat.* – 2013. – T. 34, № 2. – C. E2382-91.
22. Blumel J., Schmidt I., Effenberger W., Seitz H., Willkommen H., Brackmann H. H., Lower J., Eis-Hubinger A. M. Parvovirus B19 transmission by heat-treated clotting factor concentrates // *Transfusion.* – 2002. – T. 42, № 11. – C. 1473-81.
23. Yokozaki S., Fukuda Y., Nakano I., Katano Y., Toyoda H., Takamatsu J. Detection of TT virus DNA in plasma-derived clotting factor concentrates // *Blood.* – 1999. – T. 94, № 10. – C. 3617.
24. Evatt B. L. Prions and haemophilia: assessment of risk // *Haemophilia.* – 1998. – T. 4, № 4. – C. 628-33.
25. Pittman D. D., Alderman E. M., Tomkinson K. N., Wang J. H., Giles A. R., Kaufman R. J. Biochemical, immunological, and in vivo functional characterization of B-domain-deleted factor VIII // *Blood.* – 1993. – T. 81, № 11. – C. 2925-35.

26. Lind P., Larsson K., Spira J., Sydow-Backman M., Almstedt A., Gray E., Sandberg H. Novel forms of B-domain-deleted recombinant factor VIII molecules. Construction and biochemical characterization // *Eur J Biochem.* – 1995. – T. 232, № 1. – C. 19-27.
27. Kessler C. M., Gill J. C., White G. C., 2nd, Shapiro A., Arkin S., Roth D. A., Meng X., Lusher J. M. B-domain deleted recombinant factor VIII preparations are bioequivalent to a monoclonal antibody purified plasma-derived factor VIII concentrate: a randomized, three-way crossover study // *Haemophilia.* – 2005. – T. 11, № 2. – C. 84-91.
28. Chun B. H., Park S. Y., Chung N., Bang W. G. Enhanced production of recombinant B-domain deleted factor VIII from Chinese hamster ovary cells by propionic and butyric acids // *Biotechnol Lett.* – 2003. – T. 25, № 4. – C. 315-9.
29. Schwartz R. S., Abildgaard C. F., Aledort L. M., Arkin S., Bloom A. L., Brackmann H. H., Brettler D. B., Fukui H., Hilgartner M. W., Inwood M. J., et al. Human recombinant DNA-derived antihemophilic factor (factor VIII) in the treatment of hemophilia A. recombinant Factor VIII Study Group // *N Engl J Med.* – 1990. – T. 323, № 26. – C. 1800-5.
30. White G. C., 2nd, McMillan C. W., Kingdon H. S., Shoemaker C. B. Use of recombinant antihemophilic factor in the treatment of two patients with classic hemophilia // *N Engl J Med.* – 1989. – T. 320, № 3. – C. 166-70.
31. Kaufman R. J., Wasley L. C., Dorner A. J. Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells // *J Biol Chem.* – 1988. – T. 263, № 13. – C. 6352-62.
32. Adamson R. Design and operation of a recombinant mammalian cell manufacturing process for rFVIII // *Ann Hematol.* – 1994. – T. 68 Suppl 3. – C. S9-14.
33. Yoshioka A. Products used to Treat Hemophilia: Recombinant Products // *Textbook of Hemophilia* Wiley-Blackwell, 2010. – C. 146-152.
34. Liew K. Many factor VIII products available in the treatment of hemophilia A: an embarrassment of riches? // *J Blood Med.* – 2017. – T. 8. – C. 67-73.
35. Josephson C. D., Abshire T. The new albumin-free recombinant factor VIII concentrates for treatment of hemophilia: do they represent an actual incremental improvement? // *Clin Adv Hematol Oncol.* – 2004. – T. 2, № 7. – C. 441-6.
36. Gomperts E., Lundblad R., Adamson R. The manufacturing process of recombinant factor VIII, recombinant // *Transfus Med Rev.* – 1992. – T. 6, № 4. – C. 247-51.
37. Lee D. C., Miller J. L., Petteway S. R., Jr. Pathogen safety of manufacturing processes for biological products: special emphasis on KOGENATE Bayer // *Haemophilia.* – 2002. – T. 8 Suppl 2. – C. 6-9.

38. Mahlangu J. N., Ahuja S. P., Windyga J., Church N., Shah A., Schwartz L. BAY 81-8973, a full-length recombinant factor VIII for the treatment of hemophilia A: product review // *Ther Adv Hematol.* – 2018. – T. 9, № 7. – C. 191-205.
39. Toole J. J., Pittman D. D., Orr E. C., Murtha P., Wasley L. C., Kaufman R. J. A large region (approximately equal to 95 kDa) of human factor VIII is dispensable for in vitro procoagulant activity // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1986. – T. 83, № 16. – C. 5939-42.
40. Pittman D. D., Marquette K. A., Kaufman R. J. Role of the B domain for factor VIII and factor V expression and function // *Blood.* – 1994. – T. 84, № 12. – C. 4214-25.
41. Meulien P., Faure T., Mischler F., Harrer H., Ulrich P., Bouderbala B., Dott K., Sainte Marie M., Mazurier C., Wiesel M. L., et al. A new recombinant procoagulant protein derived from the cDNA encoding human factor VIII // *Protein Eng.* – 1988. – T. 2, № 4. – C. 301-6.
42. Krishnan S., Kolbe H. V., Lepage P., Faure T., Sauerwald R., de la Salle H., Muller C., Bihoreau N., Paolantonacci P., Roitsch C., et al. Thrombin cleavage analysis of a novel antihaemophilic factor variant, factor VIII delta II // *Eur J Biochem.* – 1991. – T. 195, № 3. – C. 637-44.
43. Leyte A., van Schijndel H. B., Niehrs C., Huttner W. B., Verbeet M. P., Mertens K., van Mourik J. A. Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor // *J Biol Chem.* – 1991. – T. 266, № 2. – C. 740-6.
44. Eaton D. L., Wood W. I., Eaton D., Hass P. E., Hollingshead P., Wion K., Mather J., Lawn R. M., Vehar G. A., Gorman C. Construction and characterization of an active factor VIII variant lacking the central one-third of the molecule // *Biochemistry.* – 1986. – T. 25, № 26. – C. 8343-7.
45. Esmon P. C., Kuo H. S., Fournel M. A. Characterization of recombinant factor VIII and a recombinant factor VIII deletion mutant using a rabbit immunogenicity model system // *Blood.* – 1990. – T. 76, № 8. – C. 1593-600.
46. Herlitschka S. E., Schlokot U., Falkner F. G., Dorner F. High expression of a B-domain deleted factor VIII gene in a human hepatic cell line // *J Biotechnol.* – 1998. – T. 61, № 3. – C. 165-73.
47. Yonemura H., Sugawara K., Nakashima K., Nakahara Y., Hamamoto T., Mimaki I., Yokomizo K., Tajima Y., Masuda K., Imaizumi A., et al. Efficient production of recombinant human factor VIII by co-expression of the heavy and light chains // *Protein Eng.* – 1993. – T. 6, № 6. – C. 669-74.
48. Sandberg H., Almstedt A., Brandt J., Gray E., Holmquist L., Oswaldsson U., Sebring S., Mikaelsson M. Structural and functional characteristics of the B-domain-deleted recombinant factor VIII protein, r-VIII SQ // *Thromb Haemost.* – 2001. – T. 85, № 1. – C. 93-100.

49. Fatouros A., Osterberg T., Mikaelsson M. Recombinant factor VIII SQ--inactivation kinetics in aqueous solution and the influence of disaccharides and sugar alcohols // *Pharm Res.* – 1997. – T. 14, № 12. – C. 1679-84.
50. Osterberg T., Fatouros A., Mikaelsson M. Development of freeze-dried albumin-free formulation of recombinant factor VIII SQ // *Pharm Res.* – 1997. – T. 14, № 7. – C. 892-8.
51. Osterberg T., Fatouros A., Neidhardt E., Warne N., Mikaelsson M. B-domain deleted recombinant factor VIII formulation and stability // *Semin Hematol.* – 2001. – T. 38, № 2 Suppl 4. – C. 40-3.
52. Fijnvandraat K., Berntorp E., ten Cate J. W., Johnsson H., Peters M., Savidge G., Tengborn L., Spira J., Stahl C. Recombinant, B-domain deleted factor VIII (r-VIII SQ): pharmacokinetics and initial safety aspects in hemophilia A patients // *Thromb Haemost.* – 1997. – T. 77, № 2. – C. 298-302.
53. Eriksson R. K., Fenge C., Lindner-Olsson E., Ljungqvist C., Rosenquist J., Smeds A. L., ostlin A., Charlebois T., Leonard M., Kelley B. D., Ljungqvist A. The manufacturing process for B-domain deleted recombinant factor VIII // *Semin Hematol.* – 2001. – T. 38, № 2 Suppl 4. – C. 24-31.
54. Kelley B. D., Tannatt M., Magnusson R., Hagelberg S., Booth J. Development and validation of an affinity chromatography step using a peptide ligand for cGMP production of factor VIII // *Biotechnol Bioeng.* – 2004. – T. 87, № 3. – C. 400-12.
55. Lusher J. M., Lee C. A., Kessler C. M., Bedrosian C. L. The safety and efficacy of B-domain deleted recombinant factor VIII concentrate in patients with severe haemophilia A // *Haemophilia.* – 2003. – T. 9, № 1. – C. 38-49.
56. Smith M. P., Giangrande P., Pollman H., Littlewood R., Kollmer C., Feingold J. A postmarketing surveillance study of the safety and efficacy of ReFacto (St Louis-derived active substance) in patients with haemophilia A // *Haemophilia.* – 2005. – T. 11, № 5. – C. 444-51.
57. Recht M., Nemes L., Matysiak M., Manco-Johnson M., Lusher J., Smith M., Mannucci P., Hay C., Abshire T., O'Brien A., Hayward B., Udata C., Roth D. A., Arkin S. Clinical evaluation of moroctocog alfa (AF-CC), a new generation of B-domain deleted recombinant factor VIII (BDDrFVIII) for treatment of haemophilia A: demonstration of safety, efficacy, and pharmacokinetic equivalence to full-length recombinant factor VIII // *Haemophilia.* – 2009. – T. 15, № 4. – C. 869-80.
58. Gruppo R. A., Brown D., Wilkes M. M., Navickis R. J. Meta-analytic evidence of increased breakthrough bleeding during prophylaxis with B-domain deleted factor VIII // *Haemophilia.* – 2004. – T. 10, № 6. – C. 747-50.

59. Gruppo R. A., Brown D., Wilkes M. M., Navickis R. J. Increased breakthrough bleeding during prophylaxis with B-domain deleted factor VIII--a robust meta-analytic finding // *Haemophilia*. – 2004. – T. 10, № 5. – C. 449-51.
60. Morfini M., Cinotti S., Bellatreccia A., Paladino E., Gringeri A., Mannucci P. M. A multicenter pharmacokinetic study of the B-domain deleted recombinant factor VIII concentrate using different assays and standards // *J Thromb Haemost.* – 2003. – T. 1, № 11. – C. 2283-9.
61. Johnston A. The relevance of factor VIII (FVIII) pharmacokinetics to TDM and hemophilia a treatment: is B domain-deleted FVIII equivalent to full-length FVIII? // *Ther Drug Monit.* – 2012. – T. 34, № 1. – C. 110-7.
62. Khrenov A. V., Ananyeva N. M., Saenko E. L. Role of the B domain in proteolytic inactivation of activated coagulation factor VIII by activated protein C and activated factor X // *Blood Coagul Fibrinolysis*. – 2006. – T. 17, № 5. – C. 379-88.
63. Lusher J. M. First and second generation recombinant factor VIII concentrates in previously untreated patients: recovery, safety, efficacy, and inhibitor development // *Semin Thromb Hemost.* – 2002. – T. 28, № 3. – C. 273-6.
64. Pollmann H., Externest D., Ganser A., Eifrig B., Kreuz W., Lenk H., Pabinger I., Schramm W., Schwarz T. F., Zimmermann R., Zavazava N., Oldenburg J., Klamroth R. Efficacy, safety and tolerability of recombinant factor VIII (REFACTO) in patients with haemophilia A: interim data from a postmarketing surveillance study in Germany and Austria // *Haemophilia*. – 2007. – T. 13, № 2. – C. 131-43.
65. Gouw S. C., van den Berg H. M., le Cessie S., van der Bom J. G. Treatment characteristics and the risk of inhibitor development: a multicenter cohort study among previously untreated patients with severe hemophilia A // *J Thromb Haemost.* – 2007. – T. 5, № 7. – C. 1383-90.
66. Aledort L. M., Navickis R. J., Wilkes M. M. Can B-domain deletion alter the immunogenicity of recombinant factor VIII? A meta-analysis of prospective clinical studies // *J Thromb Haemost.* – 2011. – T. 9, № 11. – C. 2180-92.
67. Lee C. A., Kessler C. M., Varon D., Martinowitz U., Heim M., Vermynen J. How do some haemophiliacs develop inhibitors? // *Haemophilia*. – 1998. – T. 4, № 4. – C. 538-542.
68. Thim L., Vandahl B., Karlsson J., Klausen N. K., Pedersen J., Krogh T. N., Kjalke M., Petersen J. M., Johnsen L. B., Bolt G., Norby P. L., Steenstrup T. D. Purification and characterization of a new recombinant factor VIII (N8) // *Haemophilia*. – 2010. – T. 16, № 2. – C. 349-59.
69. Martinowitz U., Bjerre J., Brand B., Klamroth R., Misgav M., Morfini M., Santagostino E., Tiede A., Viuff D. Bioequivalence between two serum-free recombinant factor VIII preparations

(N8 and ADVATE(R))--an open-label, sequential dosing pharmacokinetic study in patients with severe haemophilia A // *Haemophilia*. – 2011. – T. 17, № 6. – C. 854-9.

70. Sandberg H., Kannicht C., Stenlund P., Dadaian M., Oswaldsson U., Cordula C., Walter O. Functional characteristics of the novel, human-derived recombinant FVIII protein product, human-cl rhFVIII // *Thrombosis Research*. – 2012. – T. 130, № 5. – C. 808-817.

71. Cho M. S., Yee H., Brown C., Mei B., Mirenda C., Chan S. Versatile expression system for rapid and stable production of recombinant proteins // *Biotechnol Prog*. – 2003. – T. 19, № 1. – C. 229-32.

72. Mei B., Chen Y., Chen J., Pan C. Q., Murphy J. E. Expression of human coagulation factor VIII in a human hybrid cell line, HKB11 // *Mol Biotechnol*. – 2006. – T. 34, № 2. – C. 165-78.

73. Miao H. Z., Sirachainan N., Palmer L., Kucab P., Cunningham M. A., Kaufman R. J., Pipe S. W. Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion // *Blood*. – 2004. – T. 103, № 9. – C. 3412-9.

74. Kolind M. P., Norby P. L., Flintegaard T. V., Berchtold M. W., Johnsen L. B. The B-domain of Factor VIII reduces cell membrane attachment to host cells under serum free conditions // *J Biotechnol*. – 2010. – T. 147, № 3-4. – C. 198-204.

75. Selvaraj S. R., Scheller A. N., Miao H. Z., Kaufman R. J., Pipe S. W. Bioengineering of coagulation factor VIII for efficient expression through elimination of a dispensable disulfide loop // *J Thromb Haemost*. – 2012. – T. 10, № 1. – C. 107-15.

76. Ar M. C., Balkan C., Kavakli K. Extended Half-Life (EHL) Coagulation Factors: A New Era in the Management of Haemophilia Patients // *Turk J Haematol*. – 2019.10.4274/tjh.galenos.2019.2018.0393.

77. Lynch C. M., Israel D. I., Kaufman R. J., Miller A. D. Sequences in the coding region of clotting factor VIII act as dominant inhibitors of RNA accumulation and protein production // *Hum Gene Ther*. – 1993. – T. 4, № 3. – C. 259-72.

78. Koeberl D. D., Halbert C. L., Krumm A., Miller A. D. Sequences within the coding regions of clotting factor VIII and CFTR block transcriptional elongation // *Hum Gene Ther*. – 1995. – T. 6, № 4. – C. 469-79.

79. Hoeben R. C., Fallaux F. J., Cramer S. J., van den Wollenberg D. J., van Ormondt H., Briet E., van der Eb A. J. Expression of the blood-clotting factor-VIII cDNA is repressed by a transcriptional silencer located in its coding region // *Blood*. – 1995. – T. 85, № 9. – C. 2447-54.

80. Fallaux F. J., Hoeben R. C., Cramer S. J., van den Wollenberg D. J., Briet E., van Ormondt H., van Der Eb A. J. The human clotting factor VIII cDNA contains an autonomously replicating sequence consensus- and matrix attachment region-like sequence that binds a nuclear factor,

represses heterologous gene expression, and mediates the transcriptional effects of sodium butyrate // *Mol Cell Biol.* – 1996. – T. 16, № 8. – C. 4264-72.

81. Dorner A. J., Wasley L. C., Kaufman R. J. Increased synthesis of secreted proteins induces expression of glucose-regulated proteins in butyrate-treated Chinese hamster ovary cells // *J Biol Chem.* – 1989. – T. 264, № 34. – C. 20602-7.

82. Matsuhisa T., Okada M., Mori Y. Induction of blood coagulation factor VIII by sodium butyrate in Balb/c 3T3 cells // *Exp Cell Res.* – 1989. – T. 180, № 1. – C. 1-12.

83. Ward N. J., Buckley S. M., Waddington S. N., Vandendriessche T., Chuah M. K., Nathwani A. C., McIntosh J., Tuddenham E. G., Kinnon C., Thrasher A. J., McVey J. H. Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high-level expression // *Blood.* – 2011. – T. 117, № 3. – C. 798-807.

84. Liles D., Landen C. N., Monroe D. M., Lindley C. M., Read M. S., Roberts H. R., Brinkhous K. M. Extravascular administration of factor IX: potential for replacement therapy of canine and human hemophilia B // *Thromb Haemost.* – 1997. – T. 77, № 5. – C. 944-8.

85. Dunne M. J., Kane C., Shepherd R. M., Sanchez J. A., James R. F., Johnson P. R., Aynsley-Green A., Lu S., Clement J. P. t., Lindley K. J., Seino S., Aguilar-Bryan L. Familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy and mutations in the sulfonylurea receptor // *N Engl J Med.* – 1997. – T. 336, № 10. – C. 703-6.

86. Roe S. M., Gormal C., Smith B. E., Baker P., Rice D., Card G., Lindley P. Crystallization and preliminary X-ray studies of nitrogenase component 1 (the MoFe protein) from *Klebsiella pneumoniae* // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 1997. – T. 53, № Pt 2. – C. 227-8.

87. Lindley E. J. EDTNA/ERCA research forum // *EDTNA ERCA J.* – 1997. – T. 23, № 2. – C. 50-1.

88. Ishaque A., Thrift J., Murphy J. E., Konstantinov K. Over-expression of Hsp70 in BHK-21 cells engineered to produce recombinant factor VIII promotes resistance to apoptosis and enhances secretion // *Biotechnol Bioeng.* – 2007. – T. 97, № 1. – C. 144-55.

89. Nivitchanyong T., Martinez A., Ishaque A., Murphy J. E., Konstantinov K., Betenbaugh M. J., Thrift J. Anti-apoptotic genes Aven and E1B-19K enhance performance of BHK cells engineered to express recombinant factor VIII in batch and low perfusion cell culture // *Biotechnol Bioeng.* – 2007. – T. 98, № 4. – C. 825-41.

90. Malhotra J. D., Miao H., Zhang K., Wolfson A., Pennathur S., Pipe S. W., Kaufman R. J. Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2008. – T. 105, № 47. – C. 18525-18530.

91. Li X., Gabriel D. A. The physical exchange of factor VIII (FVIII) between von Willebrand factor and activated platelets and the effect of the FVIII B-domain on platelet binding // *Biochemistry*. – 1997. – T. 36, № 35. – C. 10760-7.
92. Kolind M. P., Norby P. L., Berchtold M. W., Johnsen L. B. Optimisation of the Factor VIII yield in mammalian cell cultures by reducing the membrane bound fraction // *J Biotechnol*. – 2011. – T. 151, № 4. – C. 357-62.
93. Zhong D., Bajaj M. S., Schmidt A. E., Bajaj S. P. The N-terminal epidermal growth factor-like domain in factor IX and factor X represents an important recognition motif for binding to tissue factor // *J Biol Chem*. – 2002. – T. 277, № 5. – C. 3622-31.
94. Howard E. L., Becker K. C., Rusconi C. P., Becker R. C. Factor IXa inhibitors as novel anticoagulants // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2007. – T. 27, № 4. – C. 722-7.
95. Green P. M., Giannelli F., Sommer S. S., Poon M-C., Ludwig M., Schwaab R., Reitsma P.H., Goossens M., Yoshioka A., Figueiredo M.S., Tagariello G., G.G. B. The Haemophilia B Mutation Database – version 13. – 2004. – URL: <http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html>.
96. Rogaev E. I., Grigorenko A. P., Faskhutdinova G., Kittler E. L., Moliaka Y. K. Genotype analysis identifies the cause of the "royal disease" // *Science*. – 2009. – T. 326, № 5954. – C. 817.
97. Reitsma P. H., Bertina R. M., Ploos van Amstel J. K., Riemens A., Briet E. The putative factor IX gene promoter in hemophilia B Leyden // *Blood*. – 1988. – T. 72, № 3. – C. 1074-6.
98. Evatt B. L., Black C., Batorova A., Street A., Srivastava A. Comprehensive care for haemophilia around the world // *Haemophilia*. – 2004. – T. 10 Suppl 4. – C. 9-13.
99. Tabor E. The epidemiology of virus transmission by plasma derivatives: clinical studies verifying the lack of transmission of hepatitis B and C viruses and HIV type 1 // *Transfusion*. – 1999. – T. 39, № 11-12. – C. 1160-8.
100. Kim H. C., McMillan C. W., White G. C., Bergman G. E., Horton M. W., Saidi P. Purified factor IX using monoclonal immunoaffinity technique: clinical trials in hemophilia B and comparison to prothrombin complex concentrates // *Blood*. – 1992. – T. 79, № 3. – C. 568-75.
101. Ludlam C. A., Powderly W. G., Bozzette S., Diamond M., Koerper M. A., Kulkarni R., Ritchie B., Siegel J., Simmonds P., Stanley S., Tapper M. L., von Depka M. Clinical perspectives of emerging pathogens in bleeding disorders // *Lancet*. – 2006. – T. 367, № 9506. – C. 252-61.
102. Kurachi K., Davie E. W. Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1982. – T. 79, № 21. – C. 6461-4.
103. Anson D. S., Austen D. E., Brownlee G. G. Expression of active human clotting factor IX from recombinant DNA clones in mammalian cells // *Nature*. – 1985. – T. 315, № 6021. – C. 683-5.

104. de la Salle H., Altenburger W., Elkaim R., Dott K., Dieterle A., Drillien R., Cazenave J. P., Tolstoshev P., Lecocq J. P. Active gamma-carboxylated human factor IX expressed using recombinant DNA techniques // *Nature*. – 1985. – T. 316, № 6025. – C. 268-70.
105. Busby S., Kumar A., Joseph M., Halfpaw L., Insley M., Berkner K., Kurachi K., Woodbury R. Expression of active human factor IX in transfected cells // *Nature*. – 1985. – T. 316, № 6025. – C. 271-3.
106. Kaufman R. J., Wasley L. C., Furie B. C., Furie B., Shoemaker C. B. Expression, purification, and characterization of recombinant gamma-carboxylated factor IX synthesized in Chinese hamster ovary cells // *J Biol Chem*. – 1986. – T. 261, № 21. – C. 9622-8.
107. Harrison S., Adamson S., Bonam D., Brodeur S., Charlebois T., Clancy B., Costigan R., Drapeau D., Hamilton M., Hanley K., Kelley B., Knight A., Leonard M., McCarthy M., Oakes P., Sterl K., Switzer M., Walsh R., Foster W. The manufacturing process for recombinant factor IX // *Semin Hematol*. – 1998. – T. 35, № 2 Suppl 2. – C. 4-10.
108. Bush L., Webb C., Bartlett L., Burnett B. The formulation of recombinant factor IX: stability, robustness, and convenience // *Semin Hematol*. – 1998. – T. 35, № 2 Suppl 2. – C. 18-21.
109. Lambert T., Recht M., Valentino L. A., Powell J. S., Udata C., Sullivan S. T., Roth D. A. Reformulated BeneFix: efficacy and safety in previously treated patients with moderately severe to severe haemophilia B // *Haemophilia*. – 2007. – T. 13, № 3. – C. 233-43.
110. White G., Shapiro A., Ragni M., Garzone P., Goodfellow J., Tubridy K., Courter S. Clinical evaluation of recombinant factor IX // *Semin Hematol*. – 1998. – T. 35, № 2 Suppl 2. – C. 33-8.
111. Rup B. Immune responses to recombinant factor IX (BeneFIX) and recombinant B domain deleted factor VIII (ReFacto) // *Dev Biol (Basel)*. – 2002. – T. 109. – C. 103-6.
112. Bond M., Jankowski M., Patel H., Karnik S., Strang A., Xu B., Rouse J., Koza S., Letwin B., Steckert J., Amphlett G., Scoble H. Biochemical characterization of recombinant factor IX // *Semin Hematol*. – 1998. – T. 35, № 2 Suppl 2. – C. 11-7.
113. Ewenstein B. M., Joist J. H., Shapiro A. D., Hofstra T. C., Leissing C. A., Seremetis S. V., Broder M., Mueller-Velten G., Schwartz B. A. Pharmacokinetic analysis of plasma-derived and recombinant F IX concentrates in previously treated patients with moderate or severe hemophilia B // *Transfusion*. – 2002. – T. 42, № 2. – C. 190-7.
114. Bjorkman S. A commentary on the differences in pharmacokinetics between recombinant and plasma-derived factor IX and their implications for dosing // *Haemophilia*. – 2011. – T. 17, № 2. – C. 179-84.
115. Rouse J. C., McClellan J. E., Patel H. K., Jankowski M. A., Porter T. J. Top-down characterization of protein pharmaceuticals by liquid chromatography/mass spectrometry:

- application to recombinant factor IX comparability- a case study // *Methods Mol Biol.* – 2005. – T. 308. – C. 435-60.
116. Valentino L. A. The role of Rixubis in the treatment of hemophilia B // *Immunotherapy.* – 2014. – T. 6, № 4. – C. 381-94.
117. Derian C. K., VanDusen W., Przysiecki C. T., Walsh P. N., Berkner K. L., Kaufman R. J., Friedman P. A. Inhibitors of 2-ketoglutarate-dependent dioxygenases block aspartyl beta-hydroxylation of recombinant human factor IX in several mammalian expression systems // *J Biol Chem.* – 1989. – T. 264, № 12. – C. 6615-8.
118. Spitzer S. G., Kuppuswamy M. N., Saini R., Kasper C. K., Birktoft J. J., Bajaj S. P. Factor IX Hollywood: substitution of Pro55 by Ala in the first epidermal growth factor-like domain // *Blood.* – 1990. – T. 76, № 8. – C. 1530-7.
119. Rees D. J., Jones I. M., Handford P. A., Walter S. J., Esnouf M. P., Smith K. J., Brownlee G. G. The role of beta-hydroxyaspartate and adjacent carboxylate residues in the first EGF domain of human factor IX // *EMBO J.* – 1988. – T. 7, № 7. – C. 2053-61.
120. Ahmad S. S., Rawala R., Cheung W. F., Stafford D. W., Walsh P. N. The role of the second growth-factor domain of human factor IXa in binding to platelets and in factor-X activation // *Biochem J.* – 1995. – T. 310 (Pt 2). – C. 427-31.
121. Chang Y. J., Wu H. L., Hamaguchi N., Hsu Y. C., Lin S. W. Identification of functionally important residues of the epidermal growth factor-2 domain of factor IX by alanine-scanning mutagenesis. Residues Asn(89)-Gly(93) are critical for binding factor VIIIa // *J Biol Chem.* – 2002. – T. 277, № 28. – C. 25393-9.
122. Larson P. J., Stanfield-Oakley S. A., VanDusen W. J., Kasper C. K., Smith K. J., Monroe D. M., High K. A. Structural integrity of the gamma-carboxyglutamic acid domain of human blood coagulation factor IXa is required for its binding to cofactor VIIIa // *J Biol Chem.* – 1996. – T. 271, № 7. – C. 3869-76.
123. Harris R. J., van Halbeek H., Glushka J., Basa L. J., Ling V. T., Smith K. J., Spellman M. W. Identification and structural analysis of the tetrasaccharide NeuAc alpha(2-->6)Gal beta(1-->4)GlcNAc beta(1-->3)Fuc alpha 1-->O-linked to serine 61 of human factor IX // *Biochemistry.* – 1993. – T. 32, № 26. – C. 6539-47.
124. Agarwala K. L., Kawabata S., Takao T., Murata H., Shimonishi Y., Nishimura H., Iwanaga S. Activation peptide of human factor IX has oligosaccharides O-glycosidically linked to threonine residues at 159 and 169 // *Biochemistry.* – 1994. – T. 33, № 17. – C. 5167-71.
125. Kaufman R. J. Post-translational modifications required for coagulation factor secretion and function // *Thromb Haemost.* – 1998. – T. 79, № 6. – C. 1068-79.

126. Makino Y., Omichi K., Kuraya N., Ogawa H., Nishimura H., Iwanaga S., Hase S. Structural analysis of N-linked sugar chains of human blood clotting factor IX // *J Biochem.* – 2000. – T. 128, № 2. – C. 175-80.
127. Bharadwaj D., Harris R. J., Kisiel W., Smith K. J. Enzymatic removal of sialic acid from human factor IX and factor X has no effect on their coagulant activity // *J Biol Chem.* – 1995. – T. 270, № 12. – C. 6537-42.
128. Sunnerhagen M. S., Persson E., Dahlqvist I., Drakenberg T., Stenflo J., Mayhew M., Robin M., Handford P., Tilley J. W., Campbell I. D., et al. The effect of aspartate hydroxylation on calcium binding to epidermal growth factor-like modules in coagulation factors IX and X // *J Biol Chem.* – 1993. – T. 268, № 31. – C. 23339-44.
129. McGrath B. M. Factor IX (protease zymogen) // *Directory of therapeutic enzymes* / Barry M. McGrath D. G. W. Taylor & Francis, 2005. – C. 209-238.
130. Dadehbeigi N., Ostad S. N., Faramarzi M. A., Ghahremani M. H. Sex hormones affect the production of recombinant Factor IX in CHO and HEK-293 cell lines // *Biotechnol Lett.* – 2008. – T. 30, № 11. – C. 1909-12.
131. de Castilho Fernandes A., Fontes A., Gonsales N., Swiech K., Picanco-Castro V., Faca S., Covas D. Stable and high-level production of recombinant Factor IX in human hepatic cell line // *Biotechnol Appl Biochem.* – 2011. – T. 58, № 4. – C. 243-9.
132. Kim W. H., Kim J. S., Yoon Y., Lee G. M. Effect of Ca²⁺ and Mg²⁺ concentration in culture medium on the activation of recombinant factor IX produced in Chinese hamster ovary cells // *J Biotechnol.* – 2009. – T. 142, № 3-4. – C. 275-8.
133. Lim I., Kim J.-S., Lee G., Choi M., Yoon Y. The Effects of Medium Supplement on High-Level Production of Recombinant Human Factor IX in CHO Cell Cells and Culture / Noll T. Springer Netherlands, 2010. – C. 613-618.
134. Wasley L. C., Rehemtulla A., Bristol J. A., Kaufman R. J. PACE/furin can process the vitamin K-dependent pro-factor IX precursor within the secretory pathway // *J Biol Chem.* – 1993. – T. 268, № 12. – C. 8458-65.
135. Peters R. T., Low S. C., Kamphaus G. D., Dumont J. A., Amari J. V., Lu Q., Zarbis-Papastoitsis G., Reidy T. J., Merricks E. P., Nichols T. C., Bitonti A. J. Prolonged activity of factor IX as a monomeric Fc fusion protein // *Blood.* – 2010. – T. 115, № 10. – C. 2057-64.
136. Gillis S., Furie B. C., Furie B., Patel H., Huberty M. C., Switzer M., Foster W. B., Scoble H. A., Bond M. D. gamma-Carboxyglutamic acids 36 and 40 do not contribute to human factor IX function // *Protein Sci.* – 1997. – T. 6, № 1. – C. 185-96.

137. Wajih N., Hutson S. M., Owen J., Wallin R. Increased production of functional recombinant human clotting factor IX by baby hamster kidney cells engineered to overexpress VKORC1, the vitamin K 2,3-epoxide-reducing enzyme of the vitamin K cycle // *J Biol Chem.* – 2005. – T. 280, № 36. – C. 31603-7.
138. McClure D. B., Walls J. D., Grinnell B. W. Post-translational processing events in the secretion pathway of human protein C, a complex vitamin K-dependent antithrombotic factor // *J Biol Chem.* – 1992. – T. 267, № 27. – C. 19710-7.
139. Bolt G., Steenstrup T. D., Kristensen C. All post-translational modifications except propeptide cleavage are required for optimal secretion of coagulation factor VII // *Thromb Haemost.* – 2007. – T. 98, № 5. – C. 988-97.
140. Vatandoost J., Zomorodipour A., Sadeghizadeh M., Aliyari R., Bos M. H., Ataei F. Expression of biologically active human clotting factor IX in *Drosophila* S2 cells: gamma-carboxylation of a human vitamin K-dependent protein by the insect enzyme // *Biotechnol Prog.* – 2011.10.1002/btpr.723.
141. Clark A. J., Ali S., Archibald A. L., Bessos H., Brown P., Harris S., McClenaghan M., Prowse C., Simons J. P., Whitelaw C. B., et al. The molecular manipulation of milk composition // *Genome.* – 1989. – T. 31, № 2. – C. 950-5.
142. Schnieke A. E., Kind A. J., Ritchie W. A., Mycock K., Scott A. R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A., Campbell K. H. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts // *Science.* – 1997. – T. 278, № 5346. – C. 2130-3.
143. Zhang K., Wang H., Bao Y., Lu D., Xue J., Qiu X., Huang S., Huang Y., Li B., Li H., Zeng Y. Human clotting factor IX (hF IX) secretion in goat milk after direct transfer with hF IX minigene into mammary gland by using retroviral vectors // *CHINESE SCIENCE BULLETIN.* – 1997. – T. 42, № 15. – C. 1308-1313.
144. Van Cott K. E., Butler S. P., Russell C. G., Subramanian A., Lubon H., Gwazdauskas F. C., Knight J., Drohan W. N., Velander W. H. Transgenic pigs as bioreactors: a comparison of gamma-carboxylation of glutamic acid in recombinant human protein C and factor IX by the mammary gland // *Genet Anal.* – 1999. – T. 15, № 3-5. – C. 155-60.
145. Lindsay M., Gil G. C., Cadiz A., Velander W. H., Zhang C., Van Cott K. E. Purification of recombinant DNA-derived factor IX produced in transgenic pig milk and fractionation of active and inactive subpopulations // *J Chromatogr A.* – 2004. – T. 1026, № 1-2. – C. 149-57.
146. Gil G. C., Velander W. H., Van Cott K. E. Analysis of the N-glycans of recombinant human Factor IX purified from transgenic pig milk // *Glycobiology.* – 2008. – T. 18, № 7. – C. 526-39.

147. Edmunds T., Van Patten S. M., Pollock J., Hanson E., Bernasconi R., Higgins E., Manavalan P., Ziomek C., Meade H., McPherson J. M., Cole E. S. Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin // *Blood*. – 1998. – T. 91, № 12. – C. 4561-71.
148. Yull F., Harold G., Wallace R., Cowper A., Percy J., Cottingham I., Clark A. J. Fixing human factor IX (fIX): correction of a cryptic RNA splice enables the production of biologically active fIX in the mammary gland of transgenic mice // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1995. – T. 92, № 24. – C. 10899-903.
149. Dove A. Milking the genome for profit // *Nat Biotechnol*. – 2000. – T. 18, № 10. – C. 1045-8.
150. Panno J. *Animal Cloning: The Science of Nuclear Transfer* // *Book Animal Cloning: The Science of Nuclear Transfer / EditorFacts on File (October 2004)*, 2004.
151. Gomord V., Faye L. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants // *Curr Opin Plant Biol*. – 2004. – T. 7, № 2. – C. 171-81.
152. Zhang H., Zhao L., Chen Y., Cui L., Ren W., Tang K. Expression of human coagulation Factor IX in transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) // *Biotechnol Appl Biochem*. – 2007. – T. 48, № Pt 2. – C. 101-7.
153. Cunha N. B., Murad A. M., Ramos G. L., Maranhao A. Q., Brigido M. M., Araujo A. C., Lacorte C., Aragao F. J., Covas D. T., Fontes A. M., Souza G. H., Vianna G. R., Rech E. L. Accumulation of functional recombinant human coagulation factor IX in transgenic soybean seeds // *Transgenic Res*. – 2011. – T. 20, № 4. – C. 841-55.
154. DiMichele D. Inhibitor development in haemophilia B: an orphan disease in need of attention // *Br J Haematol*. – 2007. – T. 138, № 3. – C. 305-15.
155. Verma D., Moghimi B., LoDuca P. A., Singh H. D., Hoffman B. E., Herzog R. W., Daniell H. Oral delivery of bioencapsulated coagulation factor IX prevents inhibitor formation and fatal anaphylaxis in hemophilia B mice // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2010. – T. 107, № 15. – C. 7101-6.
156. Chang J., Jin J., Lollar P., Bode W., Brandstetter H., Hamaguchi N., Straight D. L., Stafford D. W. Changing residue 338 in human factor IX from arginine to alanine causes an increase in catalytic activity // *J Biol Chem*. – 1998. – T. 273, № 20. – C. 12089-94.
157. Hopfner K. P., Brandstetter H., Karcher A., Kopetzki E., Huber R., Engh R. A., Bode W. Converting blood coagulation factor IXa into factor Xa: dramatic increase in amidolytic activity identifies important active site determinants // *EMBO J*. – 1997. – T. 16, № 22. – C. 6626-35.

158. Sichler K., Kopetzki E., Huber R., Bode W., Hopfner K. P., Brandstetter H. Physiological FIXa activation involves a cooperative conformational rearrangement of the 99-loop // *J Biol Chem.* – 2003. – T. 278, № 6. – C. 4121-6.
159. Milanov P., Ivanciu L., Abriss D., Quade-Lyssy P., Miesbach W., Alesci S., Tonn T., Grez M., Seifried E., Schuttrumpf J. Engineered factor IX variants bypass FVIII and correct hemophilia A phenotype in mice // *Blood* 2011-05-353672 [pii] 10.1182/blood-2011-05-353672.
160. Metzner H. J., Weimer T., Kronthaler U., Lang W., Schulte S. Genetic fusion to albumin improves the pharmacokinetic properties of factor IX // *Thromb Haemost.* – 2009. – T. 102, № 4. – C. 634-44.
161. Dumont J. A., Low S. C., Peters R. T., Bitonti A. J. Monomeric Fc fusions: impact on pharmacokinetic and biological activity of protein therapeutics // *BioDrugs.* – 2006. – T. 20, № 3. – C. 151-60.
162. Shapiro A. D., Ragni M., Valentino L., KEY N., N. JOSEPHSON J. P., G. CHENG, K.L. TUBRIDY,, R. PETERS J. D., A. LUK, B. HALLEN, P . GOZZI,, A. BITONTI G. F. P. Safety and prolonged biological activity following a single administration of a recombinant molecular fusion of native human coagulation factor IX and the Fc region of immunoglobulin G (IgG) (rFIXFc) to subjects with hemophilia B // *Haemophilia.* – 2010. – T. 16, № Supplement s4. – C. 1-158.
163. Ostergaard H., Bjelke J. R., Hansen L., Petersen L. C., Pedersen A. A., Elm T., Moller F., Hermit M. B., Holm P. K., Krogh T. N., Petersen J. M., Ezban M., Sorensen B. B., Andersen M. D., Agerso H., Ahmadian H., Balling K. W., Christiansen M. L., Knobe K., Nichols T. C., Bjorn S. E., Tranholm M. Prolonged half-life and preserved enzymatic properties of factor IX selectively PEGylated on native N-glycans in the activation peptide // *Blood.* – 2011. – T. 118, № 8. – C. 2333-41.
164. Negrier C., Knobe K., Tiede A., Giangrande P., Moss J. Enhanced pharmacokinetic properties of a glycoPEGylated recombinant factor IX: a first human dose trial in patients with hemophilia B // *Blood.* – 2011. – T. 118, № 10. – C. 2695-701.
165. Kim H. S., Kim J. C., Lee Y. K., Kim J. S., Park Y. S. Hepatic control elements promote long-term expression of human coagulation factor IX gene in hydrodynamically transfected mice // *J Gene Med.* – 2011. – T. 13, № 7-8. – C. 365-72.
166. Palmer T. D., Thompson A. R., Miller A. D. Production of human factor IX in animals by genetically modified skin fibroblasts: potential therapy for hemophilia B // *Blood.* – 1989. – T. 73, № 2. – C. 438-45.

167. Chen L., Nelson D. M., Zheng Z., Morgan R. A. Ex vivo fibroblast transduction in rabbits results in long-term (>600 days) factor IX expression in a small percentage of animals // *Hum Gene Ther.* – 1998. – T. 9, № 16. – C. 2341-51.
168. Qiu X., Lu D., Zhou J., Wang J., Yang J., Meng P., Hsueh J. L. Implantation of autologous skin fibroblast genetically modified to secrete clotting factor IX partially corrects the hemorrhagic tendencies in two hemophilia B patients // *Chin Med J (Engl).* – 1996. – T. 109, № 11. – C. 832-9.
169. Tsui L. V., Kelly M., Zayek N., Rojas V., Ho K., Ge Y., Moskalenko M., Mondesire J., Davis J., Roey M. V., Dull T., McArthur J. G. Production of human clotting Factor IX without toxicity in mice after vascular delivery of a lentiviral vector // *Nat Biotechnol.* – 2002. – T. 20, № 1. – C. 53-7.
170. Petrus I., Chuah M., VandenDriessche T. Gene therapy strategies for hemophilia: benefits versus risks // *J Gene Med.* – 2010. – T. 12, № 10. – C. 797-809.
171. Brown B. D., Cantore A., Annoni A., Sergi L. S., Lombardo A., Della Valle P., D'Angelo A., Naldini L. A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice // *Blood.* – 2007. – T. 110, № 13. – C. 4144-52.
172. Zhang G., Shi Q., Fahs S. A., Kuether E. L., Walsh C. E., Montgomery R. R. Factor IX ectopically expressed in platelets can be stored in alpha-granules and corrects the phenotype of hemophilia B mice // *Blood* – T. 116, № 8. – C. 1235-43.
173. Pastore L., Morral N., Zhou H., Garcia R., Parks R. J., Kochanek S., Graham F. L., Lee B., Beaudet A. L. Use of a liver-specific promoter reduces immune response to the transgene in adenoviral vectors // *Hum Gene Ther.* – 1999. – T. 10, № 11. – C. 1773-81.
174. Ehrhardt A., Kay M. A. A new adenoviral helper-dependent vector results in long-term therapeutic levels of human coagulation factor IX at low doses in vivo // *Blood.* – 2002. – T. 99, № 11. – C. 3923-30.
175. Ehrhardt A., Xu H., Dillow A. M., Bellinger D. A., Nichols T. C., Kay M. A. A gene-deleted adenoviral vector results in phenotypic correction of canine hemophilia B without liver toxicity or thrombocytopenia // *Blood.* – 2003. – T. 102, № 7. – C. 2403-11.
176. Brunetti-Pierri N., Nichols T. C., McCorquodale S., Merricks E., Palmer D. J., Beaudet A. L., Ng P. Sustained phenotypic correction of canine hemophilia B after systemic administration of helper-dependent adenoviral vector // *Hum Gene Ther.* – 2005. – T. 16, № 7. – C. 811-20.
177. Snyder R. O., Miao C. H., Patijn G. A., Spratt S. K., Danos O., Nagy D., Gown A. M., Winther B., Meuse L., Cohen L. K., Thompson A. R., Kay M. A. Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors // *Nat Genet.* – 1997. – T. 16, № 3. – C. 270-6.

178. Allay J. A., Sleep S., Long S., Tillman D. M., Clark R., Carney G., Fagone P., McIntosh J. H., Nienhuis A. W., Davidoff A. M., Nathwani A. C., Gray J. T. Good manufacturing practice production of self-complementary serotype 8 adeno-associated viral vector for a hemophilia B clinical trial // *Hum Gene Ther* – T. 22, № 5. – C. 595-604.
179. Herzog R. W., Yang E. Y., Couto L. B., Hagstrom J. N., Elwell D., Fields P. A., Burton M., Bellinger D. A., Read M. S., Brinkhous K. M., Podsakoff G. M., Nichols T. C., Kurtzman G. J., High K. A. Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector // *Nat Med.* – 1999. – T. 5, № 1. – C. 56-63.
180. Herzog R. W., Mount J. D., Arruda V. R., High K. A., Lothrop C. D., Jr. Muscle-directed gene transfer and transient immune suppression result in sustained partial correction of canine hemophilia B caused by a null mutation // *Mol Ther.* – 2001. – T. 4, № 3. – C. 192-200.
181. Herzog R. W., Fields P. A., Arruda V. R., Brubaker J. O., Armstrong E., McClintock D., Bellinger D. A., Couto L. B., Nichols T. C., High K. A. Influence of vector dose on factor IX-specific T and B cell responses in muscle-directed gene therapy // *Hum Gene Ther.* – 2002. – T. 13, № 11. – C. 1281-91.
182. Kay M. A., Manno C. S., Ragni M. V., Larson P. J., Couto L. B., McClelland A., Glader B., Chew A. J., Tai S. J., Herzog R. W., Arruda V., Johnson F., Scallan C., Skarsgard E., Flake A. W., High K. A. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector // *Nat Genet.* – 2000. – T. 24, № 3. – C. 257-61.
183. Manno C. S., Chew A. J., Hutchison S., Larson P. J., Herzog R. W., Arruda V. R., Tai S. J., Ragni M. V., Thompson A., Ozelo M., Couto L. B., Leonard D. G., Johnson F. A., McClelland A., Scallan C., Skarsgard E., Flake A. W., Kay M. A., High K. A., Glader B. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B // *Blood.* – 2003. – T. 101, № 8. – C. 2963-72.
184. Jiang H., Pierce G. F., Ozelo M. C., de Paula E. V., Vargas J. A., Smith P., Sommer J., Luk A., Manno C. S., High K. A., Arruda V. R. Evidence of multiyear factor IX expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B // *Mol Ther.* – 2006. – T. 14, № 3. – C. 452-5.
185. Snyder R. O., Miao C., Meuse L., Tubb J., Donahue B. A., Lin H. F., Stafford D. W., Patel S., Thompson A. R., Nichols T., Read M. S., Bellinger D. A., Brinkhous K. M., Kay M. A. Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors // *Nat Med.* – 1999. – T. 5, № 1. – C. 64-70.
186. Nathwani A. C., Davidoff A. M., Hanawa H., Hu Y., Hoffer F. A., Nikanorov A., Slaughter C., Ng C. Y., Zhou J., Lozier J. N., Mandrell T. D., Vanin E. F., Nienhuis A. W. Sustained high-level

expression of human factor IX (hFIX) after liver-targeted delivery of recombinant adeno-associated virus encoding the hFIX gene in rhesus macaques // *Blood*. – 2002. – T. 100, № 5. – C. 1662-9.

187. Mount J. D., Herzog R. W., Tillson D. M., Goodman S. A., Robinson N., McClelland M. L., Bellinger D., Nichols T. C., Arruda V. R., Lothrop C. D., Jr., High K. A. Sustained phenotypic correction of hemophilia B dogs with a factor IX null mutation by liver-directed gene therapy // *Blood*. – 2002. – T. 99, № 8. – C. 2670-6.

188. Wang L., Nichols T. C., Read M. S., Bellinger D. A., Verma I. M. Sustained expression of therapeutic level of factor IX in hemophilia B dogs by AAV-mediated gene therapy in liver // *Mol Ther*. – 2000. – T. 1, № 2. – C. 154-8.

189. Wang L., Takabe K., Bidlingmaier S. M., III C. R., Verma I. M. Sustained correction of bleeding disorder in hemophilia B mice by gene therapy // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1999. – T. 96, № 7. – C. 3906-10.

190. Niemeyer G. P., Herzog R. W., Mount J., Arruda V. R., Tillson D. M., Hathcock J., van Ginkel F. W., High K. A., Lothrop C. D., Jr. Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy // *Blood*. – 2009. – T. 113, № 4. – C. 797-806.

191. Manno C. S., Pierce G. F., Arruda V. R., Glader B., Ragni M., Rasko J. J., Ozelo M. C., Hoots K., Blatt P., Konkle B., Dake M., Kaye R., Razavi M., Zajko A., Zehnder J., Rustagi P. K., Nakai H., Chew A., Leonard D., Wright J. F., Lessard R. R., Sommer J. M., Tigges M., Sabatino D., Luk A., Jiang H., Mingozzi F., Couto L., Ertl H. C., High K. A., Kay M. A. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response // *Nat Med*. – 2006. – T. 12, № 3. – C. 342-7.

192. Mingozzi F., Maus M. V., Hui D. J., Sabatino D. E., Murphy S. L., Rasko J. E., Ragni M. V., Manno C. S., Sommer J., Jiang H., Pierce G. F., Ertl H. C., High K. A. CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans // *Nat Med*. – 2007. – T. 13, № 4. – C. 419-22.

193. Vandendriessche T., Thorrez L., Acosta-Sanchez A., Petrus I., Wang L., Ma L., L D. E. W., Iwasaki Y., Gillijns V., Wilson J. M., Collen D., Chuah M. K. Efficacy and safety of adeno-associated viral vectors based on serotype 8 and 9 vs. lentiviral vectors for hemophilia B gene therapy // *J Thromb Haemost*. – 2007. – T. 5, № 1. – C. 16-24.

194. Cooper M., Nayak S., Hoffman B. E., Terhorst C., Cao O., Herzog R. W. Improved induction of immune tolerance to factor IX by hepatic AAV-8 gene transfer // *Hum Gene Ther*. – 2009. – T. 20, № 7. – C. 767-76.

195. Wang L., Calcedo R., Nichols T. C., Bellinger D. A., Dillow A., Verma I. M., Wilson J. M. Sustained correction of disease in naive and AAV2-pretreated hemophilia B dogs: AAV2/8-mediated, liver-directed gene therapy // *Blood*. – 2005. – T. 105, № 8. – C. 3079-86.
196. Nathwani A. C., Rosales C., McIntosh J., Rastegarlarlari G., Nathwani D., Raj D., Nawathe S., Waddington S. N., Bronson R., Jackson S., Donahue R. E., High K. A., Mingozi F., Ng C. Y., Zhou J., Spence Y., McCarville M. B., Valentine M., Allay J., Coleman J., Sleep S., Gray J. T., Nienhuis A. W., Davidoff A. M. Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins // *Mol Ther* – T. 19, № 5. – C. 876-85.
197. Nathwani A. C., Tuddenham E. G., Rangarajan S., Rosales C., McIntosh J., Linch D. C., Chowdary P., Riddell A., Pie A. J., Harrington C., O'Beirne J., Smith K., Pasi J., Glader B., Rustagi P., Ng C. Y., Kay M. A., Zhou J., Spence Y., Morton C. L., Allay J., Coleman J., Sleep S., Cunningham J. M., Srivastava D., Basner-Tschakarjan E., Mingozi F., High K. A., Gray J. T., Reiss U. M., Nienhuis A. W., Davidoff A. M. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B // *N Engl J Med*. – 2011. – T. 365, № 25. – C. 2357-65.
198. Poon M. C., Lillicrap D., Hensman C., Card R., Scully M. F. Recombinant factor IX recovery and inhibitor safety: a Canadian post-licensure surveillance study // *Thromb Haemost*. – 2002. – T. 87, № 3. – C. 431-5.
199. Lissitchkov T., Matysiak M., Zavilka K., Laguna P., Gercheva L., Antonov A., Moret A., Caunedo P., Aznar J. A., Woodward M. K., Paez A. Head-to-head comparison of the pharmacokinetic profiles of a high-purity factor IX concentrate (AlphaNine(R)) and a recombinant factor IX (BeneFIX(R)) in patients with severe haemophilia B // *Haemophilia*. – 2013. – T. 19, № 5. – C. 674-8.
200. *Directory of Therapeutic Enzymes*. / McGrath B. M., Walsh G.: CRC Press, 2005.
201. Berkner K. L. The vitamin K-dependent carboxylase // *Annu Rev Nutr*. – 2005. – T. 25. – C. 127-49.
202. Garcia A. A., Reitsma P. H. VKORC1 and the vitamin K cycle // *Vitam Horm*. – 2008. – T. 78. – C. 23-33.
203. Wilson C. R., Sauer J. M., Carlson G. P., Wallin R., Ward M. P., Hooser S. B. Species comparison of vitamin K1 2,3-epoxide reductase activity in vitro: kinetics and warfarin inhibition // *Toxicology*. – 2003. – T. 189, № 3. – C. 191-8.
204. Schulman S., Wang B., Li W., Rapoport T. A. Vitamin K epoxide reductase prefers ER membrane-anchored thioredoxin-like redox partners // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2010. – T. 107, № 34. – C. 15027-32.

205. Tie J. K., Jin D. Y., Stafford D. W. Conserved loop cysteines of vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) are involved in its active site regeneration // *J Biol Chem.* – 2014. – T. 289, № 13. – C. 9396-407.
206. Rathnam P., Saxena B. B. Primary amino acid sequence of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands. I. alpha subunit // *J Biol Chem.* – 1975. – T. 250, № 17. – C. 6735-46.
207. Mellquist J. L., Kasturi L., Spitalnik S. L., Shakin-Eshleman S. H. The amino acid following an asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency // *Biochemistry.* – 1998. – T. 37, № 19. – C. 6833-7.
208. Recombinant follicle stimulating hormone: development of the first biotechnology product for the treatment of infertility. Recombinant Human FSH Product Development Group // *Hum Reprod Update.* – 1998. – T. 4, № 6. – C. 862-81.
209. Pierce J. G., Parsons T. F. Glycoprotein hormones: structure and function // *Annu Rev Biochem.* – 1981. – T. 50. – C. 465-95.
210. Prevost R. R. Recombinant follicle-stimulating hormone: new biotechnology for infertility // *Pharmacotherapy.* – 1998. – T. 18, № 5. – C. 1001-10.
211. Chappel S. C., Ulloa-Aguirre A., Coutifaris C. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone // *Endocr Rev.* – 1983. – T. 4, № 2. – C. 179-211.
212. Gervais A., Hammel Y. A., Pelloux S., Lepage P., Baer G., Carte N., Sorokine O., Strub J. M., Koerner R., Leize E., Van Dorsselaer A. Glycosylation of human recombinant gonadotrophins: characterization and batch-to-batch consistency // *Glycobiology.* – 2003. – T. 13, № 3. – C. 179-89.
213. Ulloa-Aguirre A., Midgley A. R., Jr., Beitins I. Z., Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance // *Endocr Rev.* – 1995. – T. 16, № 6. – C. 765-87.
214. Jiang X., Liu H., Chen X., Chen P. H., Fischer D., Sriraman V., Yu H. N., Arkininstall S., He X. Structure of follicle-stimulating hormone in complex with the entire ectodomain of its receptor // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2012. – T. 109, № 31. – C. 12491-6.
215. Baenziger J. U., Green E. D. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin // *Biochim Biophys Acta.* – 1988. – T. 947, № 2. – C. 287-306.
216. Coogan P. F., Coogan M. A. When worlds collide: observations on the integration of epidemiology and transportation behavioral analysis in the study of walking // *Am J Health Promot.* – 2004. – T. 19, № 1. – C. 39-44.

217. Morell A. G., Gregoriadis G., Scheinberg I. H., Hickman J., Ashwell G. The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation // *J Biol Chem.* – 1971. – T. 246, № 5. – C. 1461-7.
218. Fiete D., Srivastava V., Hindsgaul O., Baenziger J. U. A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO₄-4GalNAc beta 1,4GlcNAc beta 1,2Man alpha that mediates rapid clearance of lutropin // *Cell.* – 1991. – T. 67, № 6. – C. 1103-10.
219. Ulloa-Aguirre A., Timossi C., Damian-Matsumura P., Dias J. A. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone // *Endocrine.* – 1999. – T. 11, № 3. – C. 205-15.
220. Kim J. M., Byambaragchaa M., Kang M. H., Min K. S. The C-terminal Phosphorylation Sites of eel Follicle-Stimulating Hormone Receptor are Important Role in the Signal Transduction // *Dev Reprod.* – 2018. – T. 22, № 2. – C. 143-153.
221. Ninia G. J. Changes in the diameter and valve closure time of leg veins across the menstrual cycle // *Phlebology.* – 2015. – T. 22, № 2. – C. 92-93.
222. Orvieto R., Nahum R., Rabinson J., Ashkenazi J., Anteby E. Y., Meltzer S. Follitropin-alpha (Gonal-F) versus follitropin-beta (Puregon) in controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization: is there any difference? // *Fertil Steril.* – 2009. – T. 91, № 4 Suppl. – C. 1522-5.
223. Kelton C. A., Nugent N. P., Chappel S. C. Heteropolymeric protein production methods // *Book Heteropolymeric protein production methods / Editor.* – United States: Genzyme Corporation (Cambridge, MA), 1993.
224. Olijve W., de Boer W., Mulders J. W., van Wezenbeek P. M. Molecular biology and biochemistry of human recombinant follicle stimulating hormone (Puregon) // *Mol Hum Reprod.* – 1996. – T. 2, № 5. – C. 371-82.
225. Kim D. J., Seok S. H., Baek M. W., Lee H. Y., Juhn J. H., Lee S., Yun M., Park J. H. Highly expressed recombinant human follicle-stimulating hormone from Chinese hamster ovary cells grown in serum-free medium and its effect on induction of folliculogenesis and ovulation // *Fertil Steril.* – 2010. – T. 93, № 8. – C. 2652-60.
226. Schlatter S., Stansfield S. H., Dinnis D. M., Racher A. J., Birch J. R., James D. C. On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells // *Biotechnol Prog.* – 2005. – T. 21, № 1. – C. 122-33.
227. Li J., Menzel C., Meier D., Zhang C., Dubel S., Jostock T. A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies // *J Immunol Methods.* – 2007. – T. 318, № 1-2. – C. 113-24.

228. Ho S. C., Bardor M., Feng H., Mariati, Tong Y. W., Song Z., Yap M. G., Yang Y. IRES-mediated Tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing CHO cell lines // *J Biotechnol.* – 2012. – T. 157, № 1. – C. 130-9.
229. Leao Rde B., Esteves S. C. Gonadotropin therapy in assisted reproduction: an evolutionary perspective from biologics to biotech // *Clinics (Sao Paulo).* – 2014. – T. 69, № 4. – C. 279-93.
230. Munoz E., Bosch E., Fernandez I., Portela S., Ortiz G., Remohi J., Pellicer A. The role of LH in ovarian stimulation // *Curr Pharm Biotechnol.* – 2012. – T. 13, № 3. – C. 409-16.
231. Ata B., Seli E. Strategies for Controlled Ovarian Stimulation in the Setting of Ovarian Aging // *Semin Reprod Med.* – 2015. – T. 33, № 6. – C. 436-48.
232. Bleau N., Agdi M., Son W., Tan S., Dahan M. H. A Comparison of Outcomes from In Vitro Fertilization Cycles Stimulated with Follicle Stimulating Hormone Plus either Recombinant Luteinizing Hormone or Human Menopausal Gonadotropins in Subjects Treated with Long Gonadotropin Releasing Hormone Agonist Protocols // *Int J Fertil Steril.* – 2017. – T. 11, № 2. – C. 79-84.
233. Structural and Functional Roles of FSH and LH as Glycoproteins Regulating Reproduction. Mammalian Species, Gonadotropin. / Mullen M. P., Cooke D., Crow M.; Под ред. Vizcarra J.: InTech, 2013. Mammalian Species, Gonadotropin.
234. Almo S. C., Love J. D. Better and faster: improvements and optimization for mammalian recombinant protein production // *Curr Opin Struct Biol.* – 2014. – T. 26. – C. 39-43.
235. Jazayeri S. H., Amiri-Yekta A., Gourabi H., Abd Emami B., Halfinezhad Z., Abolghasemi S., Fatemi N., Daneshpour A., Ghahremani M. H., Sanati M. H., Khorramizadeh M. R. Comparative Assessment on the Expression Level of Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone (FSH) in Serum-Containing Versus Protein-Free Culture Media // *Mol Biotechnol.* – 2017.10.1007/s12033-017-0037-4.
236. Gregoriadis G., McCormack B., Wang Z., Lively R. Polysialic acids: potential in drug delivery // *FEBS Lett.* – 1993. – T. 315, № 3. – C. 271-6.
237. Fernandes A. I., Gregoriadis G. The effect of polysialylation on the immunogenicity and antigenicity of asparaginase: implication in its pharmacokinetics // *Int J Pharm.* – 2001. – T. 217, № 1-2. – C. 215-24.
238. Gregoriadis G., Jain S., Papaioannou I., Laing P. Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: a role for polysialic acids // *Int J Pharm.* – 2005. – T. 300, № 1-2. – C. 125-30.

239. Jain S., Hreczuk-Hirst D. H., McCormack B., Mital M., Epenetos A., Laing P., Gregoriadis G. Polysialylated insulin: synthesis, characterization and biological activity in vivo // *Biochim Biophys Acta*. – 2003. – T. 1622, № 1. – C. 42-9.
240. Patterson C. C., Dahlquist G. G., Gyurus E., Green A., Soltesz G., Group E. S. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study // *Lancet*. – 2009. – T. 373, № 9680. – C. 2027-33.
241. Zimmet P., Alberti K. G., Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic // *Nature*. – 2001. – T. 414, № 6865. – C. 782-7.
242. Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030 // *Diabetes Care*. – 2004. – T. 27, № 5. – C. 1047-53.
243. Vinik A. The question is, my dear watson, why did the dog not bark?: the joslin 50-year medalist study // *Diabetes Care*. – 2011. – T. 34, № 4. – C. 1060-3.
244. DeWitt D. E., Hirsch I. B. Outpatient insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus: scientific review // *JAMA*. – 2003. – T. 289, № 17. – C. 2254-64.
245. Peyrot M., Barnett A. H., Meneghini L. F., Schumm-Draeger P. M. Insulin adherence behaviours and barriers in the multinational Global Attitudes of Patients and Physicians in Insulin Therapy study // *Diabet Med*. – 2012. – T. 29, № 5. – C. 682-9.
246. McCoy R. G., Van Houten H. K., Ziegenfuss J. Y., Shah N. D., Wermers R. A., Smith S. A. Increased mortality of patients with diabetes reporting severe hypoglycemia // *Diabetes Care*. – 2012. – T. 35, № 9. – C. 1897-901.
247. Muggeo M., Zoppini G., Bonora E., Brun E., Bonadonna R. C., Moghetti P., Verlato G. Fasting plasma glucose variability predicts 10-year survival of type 2 diabetic patients: the Verona Diabetes Study // *Diabetes Care*. – 2000. – T. 23, № 1. – C. 45-50.
248. Hirsch I. B. Insulin analogues // *N Engl J Med*. – 2005. – T. 352, № 2. – C. 174-83.
249. Holleman F., Hoekstra J. B. Insulin lispro // *N Engl J Med*. – 1997. – T. 337, № 3. – C. 176-83.
250. Keating G. M. Insulin detemir: a review of its use in the management of diabetes mellitus // *Drugs*. – 2012. – T. 72, № 17. – C. 2255-87.
251. Goykhman S., Drincic A., Desmangles J. C., Rendell M. Insulin Glargine: a review 8 years after its introduction // *Expert Opin Pharmacother*. – 2009. – T. 10, № 4. – C. 705-18.
252. Campbell R. K., White J. R., Levien T., Baker D. Insulin glargine // *Clin Ther*. – 2001. – T. 23, № 12. – C. 1938-57; discussion 1923.
253. Chou D. H., Webber M. J., Tang B. C., Lin A. B., Thapa L. S., Deng D., Truong J. V., Cortinas A. B., Langer R., Anderson D. G. Glucose-responsive insulin activity by covalent

- modification with aliphatic phenylboronic acid conjugates // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2015. – T. 112, № 8. – C. 2401-6.
254. Hinds K. D., Kim S. W. Effects of PEG conjugation on insulin properties // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2002. – T. 54, № 4. – C. 505-30.
255. Bataille D., Tatemoto K., Gespach C., Jornvall H., Rosselin G., Mutt V. Isolation of glucagon-37 (bioactive enteroglucagon/oxyntomodulin) from porcine jejunum-ileum. Characterization of the peptide // *FEBS Lett.* – 1982. – T. 146, № 1. – C. 79-86.
256. Holst J. J. Enteroglucagon // *Annu Rev Physiol.* – 1997. – T. 59. – C. 257-71.
257. Dakin C. L., Small C. J., Batterham R. L., Neary N. M., Cohen M. A., Patterson M., Ghatei M. A., Bloom S. R. Peripheral oxyntomodulin reduces food intake and body weight gain in rats // *Endocrinology.* – 2004. – T. 145, № 6. – C. 2687-95.
258. Dakin C. L., Gunn I., Small C. J., Edwards C. M., Hay D. L., Smith D. M., Ghatei M. A., Bloom S. R. Oxyntomodulin inhibits food intake in the rat // *Endocrinology.* – 2001. – T. 142, № 10. – C. 4244-50.
259. Baggio L. L., Huang Q., Brown T. J., Drucker D. J. Oxyntomodulin and glucagon-like peptide-1 differentially regulate murine food intake and energy expenditure // *Gastroenterology.* – 2004. – T. 127, № 2. – C. 546-58.
260. Wynne K., Park A. J., Small C. J., Patterson M., Ellis S. M., Murphy K. G., Wren A. M., Frost G. S., Meeran K., Ghatei M. A., Bloom S. R. Subcutaneous oxyntomodulin reduces body weight in overweight and obese subjects: a double-blind, randomized, controlled trial // *Diabetes.* – 2005. – T. 54, № 8. – C. 2390-5.
261. Kervran A., Dubrasquet M., Blache P., Martinez J., Bataille D. Metabolic clearance rates of oxyntomodulin and glucagon in the rat: contribution of the kidney // *Regul Pept.* – 1990. – T. 31, № 1. – C. 41-52.
262. Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides // *Regul Pept.* – 1999. – T. 85, № 1. – C. 9-24.
263. Druce M. R., Minnion J. S., Field B. C., Patel S. R., Shillito J. C., Tilby M., Beale K. E., Murphy K. G., Ghatei M. A., Bloom S. R. Investigation of structure-activity relationships of Oxyntomodulin (Oxm) using Oxm analogs // *Endocrinology.* – 2009. – T. 150, № 4. – C. 1712-22.
264. Santoprete A., Capito E., Carrington P. E., Poci A., Finotto M., Langella A., Ingallinella P., Zytka K., Bufali S., Cianetti S., Veneziano M., Bonelli F., Zhu L., Monteagudo E., Marsh D. J., Sinharoy R., Bianchi E., Pessi A. DPP-IV-resistant, long-acting oxyntomodulin derivatives // *J Pept Sci.* – 2011. – T. 17, № 4. – C. 270-80.

265. Kerr B. D., Flatt P. R., Gault V. A. (D-Ser²)Oxm[mPEG-PAL]: a novel chemically modified analogue of oxyntomodulin with antihyperglycaemic, insulinotropic and anorexigenic actions // *Biochem Pharmacol.* – 2010. – T. 80, № 11. – C. 1727-35.
266. Lee S. H., Lee S., Youn Y. S., Na D. H., Chae S. Y., Byun Y., Lee K. C. Synthesis, characterization, and pharmacokinetic studies of PEGylated glucagon-like peptide-1 // *Bioconjug Chem.* – 2005. – T. 16, № 2. – C. 377-82.
267. Church G. M., Gilbert W. Genomic sequencing // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1984. – T. 81, № 7. – C. 1991-5.
268. Bahr S. M., Borgschulte T., Kayser K. J., Lin N. Using microarray technology to select housekeeping genes in Chinese hamster ovary cells // *Biotechnol Bioeng.* – 2009. – T. 104, № 5. – C. 1041-6.
269. *Antibodies : a laboratory manual.* / Greenfield E. A. – Second edition. изд. – xxi, 847 pages с.
270. Bristol J. A., Furie B. C., Furie B. Propeptide processing during factor IX biosynthesis. Effect of point mutations adjacent to the propeptide cleavage site // *J Biol Chem.* – 1993. – T. 268, № 10. – C. 7577-84.
271. Rost S., Fregin A., Ivaskevicius V., Conzelmann E., Hortnagel K., Pelz H. J., Lappegard K., Seifried E., Scharrer I., Tuddenham E. G., Muller C. R., Strom T. M., Oldenburg J. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2 // *Nature.* – 2004. – T. 427, № 6974. – C. 537-41.
272. Tishler M., Fieser L. F., Wendler N. L. Hydro, Oxido and Other Derivatives of Vitamin K1 and Related Compounds // *Journal of the American Chemical Society.* – 1940. – T. 62, № 10. – C. 2866-2871.
273. Patterson G. H., Knobel S. M., Sharif W. D., Kain S. R., Piston D. W. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy // *Biophys J.* – 1997. – T. 73, № 5. – C. 2782-90.
274. Shaner N. C., Campbell R. E., Steinbach P. A., Giepmans B. N., Palmer A. E., Tsien R. Y. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein // *Nat Biotechnol.* – 2004. – T. 22, № 12. – C. 1567-72.
275. Malhotra J. D., Miao H., Zhang K., Wolfson A., Pennathur S., Pipe S. W., Kaufman R. J. Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – T. 105, № 47. – C. 18525-30.
276. Stepanenko V. N., Esipov R. S., Gurevich A. I., Chupova L. A., Miroshnikov A. I. [Recombinant oxyntomodulin] // *Bioorg Khim.* – 2007. – T. 33, № 2. – C. 245-50.

277. Ellacott K. L., Morton G. J., Woods S. C., Tso P., Schwartz M. W. Assessment of feeding behavior in laboratory mice // *Cell Metab.* – 2010. – T. 12, № 1. – C. 10-7.
278. Thim L., Bjoern S., Christensen M., Nicolaisen E. M., Lund-Hansen T., Pedersen A. H., Hedner U. Amino acid sequence and posttranslational modifications of human factor VIIa from plasma and transfected baby hamster kidney cells // *Biochemistry.* – 1988. – T. 27, № 20. – C. 7785-93.
279. Cheung W. F., Stafford D. W. Localization of an epitope of a calcium-dependent monoclonal antibody to the N-terminal region of the Gla domain of human factor VII // *Thromb Res.* – 1995. – T. 79, № 2. – C. 199-206.
280. Berkner K., Busby S., Davie E., Hart C., Insley M., Kisiel W., Kumar A., Murray M., O'Hara P., Woodbury R., et al. Isolation and expression of cDNAs encoding human factor VII // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* – 1986. – T. 51 Pt 1. – C. 531-41.
281. Fann C. H., Guirgis F., Chen G., Lao M. S., Piret J. M. Limitations to the amplification and stability of human tissue-type plasminogen activator expression by Chinese hamster ovary cells // *Biotechnol Bioeng.* – 2000. – T. 69, № 2. – C. 204-12.
282. Assaraf Y. G., Molina A., Schimke R. T. Sequential amplification of dihydrofolate reductase and multidrug resistance genes in Chinese hamster ovary cells selected for stepwise resistance to the lipid-soluble antifolate trimetrexate // *J Biol Chem.* – 1989. – T. 264, № 31. – C. 18326-34.
283. Kelley B., Jankowski M., Booth J. An improved manufacturing process for Xyntha/ReFacto AF // *Haemophilia.* – 2010. – T. 16, № 5. – C. 717-25.
284. Griffith M. Ultrapure plasma factor VIII produced by anti-F VIII c immunoaffinity chromatography and solvent/detergent viral inactivation. Characterization of the Method M process and Hemofil M antihemophilic factor (human) // *Ann Hematol.* – 1991. – T. 63, № 3. – C. 131-7.
285. Tanaka H., Tapscott S. J., Trask B. J., Yao M. C. Short inverted repeats initiate gene amplification through the formation of a large DNA palindrome in mammalian cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – T. 99, № 13. – C. 8772-7.
286. Palermo D. P., DeGraaf M. E., Marotti K. R., Rehberg E., Post L. E. Production of analytical quantities of recombinant proteins in Chinese hamster ovary cells using sodium butyrate to elevate gene expression // *J Biotechnol.* – 1991. – T. 19, № 1. – C. 35-47.
287. Larson P., Zhang C., Gorina E., Getz E. B. IgG formation to mammalian proteins in hemophilia A patients following treatment with a new recombinant human factor VIII // *J Thromb Haemost.* – 2004. – T. 2, № 6. – C. 1011-2.
288. Morrill P. R., Gupta G., Sproule K., Winzor D., Christensen J., Mollerup I., Lowe C. R. Rational combinatorial chemistry-based selection, synthesis and evaluation of an affinity adsorbent

- for recombinant human clotting factor VII // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* – 2002. – T. 774, № 1. – C. 1-15.
289. Shen B. W., Spiegel P. C., Chang C. H., Huh J. W., Lee J. S., Kim J., Kim Y. H., Stoddard B. L. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII // *Blood.* – 2008. – T. 111, № 3. – C. 1240-7.
290. Ngo J. C., Huang M., Roth D. A., Furie B. C., Furie B. Crystal structure of human factor VIII: implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex // *Structure.* – 2008. – T. 16, № 4. – C. 597-606.
291. Wang H., Chen X., Zhang X., Zhang W., Li Y., Yin H., Shao H., Chen G. Comparative Assessment of Glycosylation of a Recombinant Human FSH and a Highly Purified FSH Extracted from Human Urine // *J Proteome Res.* – 2016. – T. 15, № 3. – C. 923-32.
292. Mastrangeli R., Satwekar A., Cutillo F., Ciampolillo C., Palinsky W., Longobardi S. In-vivo biological activity and glycosylation analysis of a biosimilar recombinant human follicle-stimulating hormone product (Bemfola) compared with its reference medicinal product (GONAL-f) // *PLoS One.* – 2017. – T. 12, № 9. – C. e0184139.
293. Rohde J., Demmler C. D., Mueller F., Nishi Y., Yanase T., Giese C. Development of a New Cell-Based Assay for the Determination of FSH Activity –, 2012. –
294. Steelman S. L., Pohley F. M. Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin // *Endocrinology.* – 1953. – T. 53, № 6. – C. 604-16.
295. Downs S. M., Mastropolo A. M. The participation of energy substrates in the control of meiotic maturation in murine oocytes // *Dev Biol.* – 1994. – T. 162, № 1. – C. 154-68.
296. Oonk R. B., Grootegoed J. A., van der Molen H. J. Comparison of the effects of insulin and follitropin on glucose metabolism by Sertoli cells from immature rats // *Mol Cell Endocrinol.* – 1985. – T. 42, № 1. – C. 39-48.
297. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human follicle stimulating hormone (r-hFSH) //. – 2013. – URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-non-clinical-clinical-development-similar-biological-medicinal-products-containing_en.pdf.
298. Pocai A., Carrington P. E., Adams J. R., Wright M., Eiermann G., Zhu L., Du X., Petrov A., Lassman M. E., Jiang G., Liu F., Miller C., Tota L. M., Zhou G., Zhang X., Sountis M. M., Santoprete A., Capito E., Chicchi G. G., Thornberry N., Bianchi E., Pessi A., Marsh D. J., SinhaRoy R. Glucagon-like peptide 1/glucagon receptor dual agonism reverses obesity in mice // *Diabetes.* – 2009. – T. 58, № 10. – C. 2258-66.

299. Liu Y. L., Ford H. E., Druce M. R., Minnion J. S., Field B. C., Shillito J. C., Baxter J., Murphy K. G., Ghatei M. A., Bloom S. R. Subcutaneous oxyntomodulin analogue administration reduces body weight in lean and obese rodents // *Int J Obes (Lond)*. – 2010. – T. 34, № 12. – C. 1715-25.
300. Youn Y. S., Chae S. Y., Lee S., Jeon J. E., Shin H. G., Lee K. C. Evaluation of therapeutic potentials of site-specific PEGylated glucagon-like peptide-1 isomers as a type 2 anti-diabetic treatment: Insulinotropic activity, glucose-stabilizing capability, and proteolytic stability // *Biochem Pharmacol*. – 2007. – T. 73, № 1. – C. 84-93.
301. Kaufman R. J., Schimke R. T. Amplification and loss of dihydrofolate reductase genes in a Chinese hamster ovary cell line // *Mol Cell Biol*. – 1981. – T. 1, № 12. – C. 1069-76.
302. Ng S. K. Generation of high-expressing cells by methotrexate amplification of destabilized dihydrofolate reductase selection marker // *Methods Mol Biol*. – 2012. – T. 801. – C. 161-72.
303. Kaufman R. J., Murtha P., Ingolia D. E., Yeung C. Y., Kellems R. E. Selection and amplification of heterologous genes encoding adenosine deaminase in mammalian cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1986. – T. 83, № 10. – C. 3136-40.
304. Bebbington C. R., Renner G., Thomson S., King D., Abrams D., Yarranton G. T. High-Level Expression of a Recombinant Antibody from Myeloma Cells Using a Glutamine Synthetase Gene as an Amplifiable Selectable Marker // *Bio/Technology*. – 1992. – T. 10, № 2. – C. 169-175.
305. Alves D. S., Castello-Banyuls J., Faura C. C., Ballesta J. J. An extracellular RRR motif flanking the M1 transmembrane domain governs the biogenesis of homomeric neuronal nicotinic acetylcholine receptors // *FEBS Lett*. – 2011. – T. 585, № 8. – C. 1169-74.

8. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- фVIII – фактор свертывания крови VIII;
 фVIII BDD, BDD- фVIII – фактор VIII свертывания крови с делецией домена В;
 фVIII BDD SQ - фактор VIII с делецией домена В вариант SQ;
 ВНК, ВНК-21 - клетки почки сирийского хомячка *Mesocricetus auratus*;
 BiP - immunoglobulin-binding protein; GRP78;
 CHO – Chinese hamster ovary - клетки яичника китайского хомячка, *Cricetulus griseus*;
 CNX – кальнексин;
 CRT – кальретикулин;
 DHFR – дигидрофолатредуктаза [КФ 1.5.1.3];
 dNTP – дезоксирибоинуклеотидтрифосфат;
 EBV – вирус Эпштейна-Барр;
 ELISA, ИФА – метод твердофазного иммуноферментного анализа;
 EMCV – вирус энцефаломиокардита;
 ERAD - ER-associated degradation;
 ERGIC – ER-Golgi intermediate compartment, промежуточный компартмент;
 фIX – фактор свертывания крови IX;
 GRP78 - glucose-regulated protein MW 78,000 иначе BiP;
 GTI, GTII - глюкозидазы I и II;
 HAT среда - среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин;
 HEK293 – клетки почки эмбриона человека
 HepG2 - клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека
 HT среда - среда, содержащая гипоксантин и тимидин;
 IEX – ионообменная хроматография;
 IRES – внутренний сайт связывания рибосом;
 K_d – константа диссоциации;
 K_m – константа Михаэлиса-Ментен;
 MTX – метотрексат;
 PBS – фосфатно-буферизованный раствор;
 SEC – гель-фильтрация (size exclusion chromatography);
 TEMED - тетраэтилметилендиамин;
 UGT- UDP - glucose:glycoprotein glucosyltransferase;
 UPR - unfolded protein response;
 V_{max} – максимальная скорость ферментативной реакции;

АЧТВ - активированное частичное тромбопластиновое время;
БСА – бычий сывороточный альбумин;
ВКЗ белки - витамин К-зависимые белки
Да – Дальтон;
ДМСО – диметилсульфоксид;
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
ДСН – додецилсульфат натрия;
кДа – тысяча Дальтон;
мМ– миллимолярный;
МЕ – международная единица (соответствует содержанию фактора свертывания крови в 1 мл пулированной донорской плазмы);
мкАт – моноклональное антитело;
мкг – микрограмм;
мкл – микролитр;
мл – миллилитр;
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;
НТО – нетранслируемая область;
об/мин – обороты в минуту;
ОРС – открытая рамка считывания;
ОТ-ПЦР – ПЦР с этапом обратной транскрипции;
п.о. – пар оснований;
ПААГ – полиакриламидный гель;
ПЦР - полимеразная цепная реакция;
ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени;
ПЭГ – полиэтиленгликоль;
т. п. о. - тысяча пар оснований;
Трис - трис(гидроксиметил)аминометан;
Тритон X-100 - полиоксиэтилен $(n=9,10)$ -п-третоктил-фенол;
фФВ (vVF) – фактор фон Виллебрандта;
ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота;
ЭПР – эндоплазматический ретикулум.