

УДК 573.6.086.83:577.21:[577.152.311+612.015.1]

Рекомбинантная бутирилхолинэстераза человека как биологический антидот нового поколения: разработка эукариотической системы экспрессии

Д. Г. Илюшин¹, О. М. Эртле¹, Т. В. Бобик¹, О. Г. Шамборант¹, Е. А. Сурина¹, В. Д. Кнорре¹, P. Masson², И. В. Смирнов¹, А. Г. Габибов¹, Н. А. Пономаренко¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

²Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, Département de Toxicologie, La Tronche, France

*E-mail: llyushinDenis@gmail.com

Поступила в редакцию 25.04.2012

РЕФЕРАТ Бутирилхолинэстераза (БуХЭ) – сериновая гидролаза [КФ 3.1.1.8], которая характеризуется высокой реакционной способностью стехиометрически связывать разнообразные токсины, ингибирующие ацетилхолинэстеразу, и обнаруживается практически во всех тканях млекопитающих. Это делает бутирилхолинэстеразу человека первым кандидатом на роль биологического антидота, действие которого направлено на различные фосфорорганические яды. Получение рекомбинантной БуХЭ в количествах, достаточных для инъекционного введения, затруднено из-за низкой эффективности существующих систем экспрессии. В представленной работе разработана эффективная система экспрессии рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека на основе клеток линии СНО, а также охарактеризован белок, полученный с использованием этой системы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биологический антидот, бутирилхолинэстераза, клетки линии СНО, рекомбинантный белок, фосфорорганические токсины.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ а.о. – аминокислотный остаток; БуХЭ – бутирилхолинэстераза; ПААГ – полиакриламидный гель; ФОТ – фосфорорганический токсин; СНО – Chinese hamster ovary cells (клетки яичников китайского хомячка *Cricetulus griseus*); DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла).

ВВЕДЕНИЕ

Бутирилхолинэстераза (БуХЭ) – сериновая гидролаза [КФ 3.1.1.8], обнаруженная практически во всех тканях млекопитающих, в частности в тканях легкого, кишечника, печени и в сыворотке крови [1]. Физиологическая функция БуХЭ не известна, но считается, что она играет важную роль в поддержании и контроле активности нейромедиаторов ацетилхолина в центральной нервной системе и нервно-мышечных окончаниях [2].

БуХЭ обладает способностью стехиометрически связывать разнообразные токсины, ингибирующие ацетилхолинэстеразу. В частности, БуХЭ взаимодействует с такими фосфорорганическими соединениями, как зарин, зоман, газы VX и VR и некоторыми пестицидами. Эти данные получены в опытах на грызунах [3] и приматах [4]; после внутривенного или внутримышечного введения препарата БуХЭ, выделенной из сыворотки крови человека, у животных обнаруживалась длительная устойчивость к действию нервно-паралитических агентов [5].

За последние 60 лет исследований методы медикаментозного лечения отравлений фосфорорганическими токсинами (ФОТ) активно развивались. Тем не менее все они еще несовершенны. Эти методы позволяют предотвратить смерть пациента, но не позволяют избежать необратимых поражений головного мозга и потери трудоспособности. Альтернативным подходом к медикаментозной терапии и профилактике отравлений ФОТ является использование биологических антидотов [6]. Биологическими антидотами могут быть антитела и ферменты, которые изолируют и инактивируют высокотоксичные соединения, до того как они достигнут своей биологической мишени [7]. Из всех антидотов против ФОТ только БуХЭ плазмы крови человека получила статус «New development drug» от FDA в 2006 году.

Бутирилхолинэстераза человека – гликопротеин, состоящий из четырех идентичных субъединиц. Каждая субъединица состоит из 574 а.о. и 9 полисахаридных цепей. Молекулярная масса одной субъе-

диницы БуХЭ составляет 85 кДа, из которых 23.9% приходится на полисахаридные цепи [8]. Существует несколько олигомерных форм БуХЭ: в плазме крови человека 95% БуХЭ представлено тетрамерной формой, остальные 5% приходятся на тримерную, димерную и мономерные формы [9], иногда обнаруживается гетеродимер БуХЭ с сывороточным альбумином [10]. Олигомерные формы БуХЭ обладают одинаковой удельной активностью, однако сильно различаются по фармакодинамическим характеристикам [3].

На сегодняшний день бутирилхолинэстеразу человека выделяют из плазмы крови. Опубликованный в 2005 году протокол очистки рассчитан на обработку 100 л плазмы крови человека за один цикл [4]. По оценке экспертов, для получения 1000 доз БуХЭ потребуется переработать годовой запас плазмы крови США [11]. Кроме того, при использовании донорской плазмы существует вероятность заражения препарата опасными вирусами.

Альтернативным методом является получение рекомбинантного белка. Экспрессия в клетках прокариот – технологически наиболее простой и экономически выгодный метод получения рекомбинантных белков. Однако попытки экспрессии БуХЭ в клетках *Escherichia coli* не были успешными [12].

Для получения корректно фолдированных и функционально активных рекомбинантных продуктов в последнее время широко используются культивируемые клетки животных, в частности клетки линии СНО. За последние 25 лет получено и одобрено FDA более 20 рекомбинантных белковых препаратов, в том числе альблукозидаза α (Myozyme) [13], антигемофильный фактор (ReFacto) [14], фактор свертывания крови IX (BeneFIX) [15], интерферон- β (Avonex) [16], α -галактозидаза (Fabrazyme) [17], эритропоэтин А (Eprex, Erogen) и др. Для эффективной экспрессии рекомбинантных белков в животных клетках разработан целый ряд технических средств, таких, как роллерные системы, спиннеры и биореакторы, позволяющие обеспечить продукцию целевого белка в количестве нескольких грамм на 1 л культуральной среды [18–20]. Кроме того, эффективность экспрессии достигается использованием сильных промоторов, таких, как промотор гена фактора элонгации 1 α (EF-1) [21] или цитомегаловирусный (CMV) промотор [22].

В 2002 году удалось получить рекомбинантную низкогликозилированную БуХЭ в нелимфоидных клетках линии СНО [23]. При продукции в роллерных бутылках выход целевого белка составил 2–5 мг на 1 л ростовой среды, тогда как для обеспечения рентабельности производства требуется достичь уровня продукции не менее 50–100 мг/л ростовой среды.

Помимо непосредственного увеличения уровня продукции рекомбинантной БуХЭ внимание исследова-

телей сосредоточено также на получении препарата с улучшенными фармакодинамическими характеристиками. Недавно в составе тетрамера бутирилхолинэстеразы человека обнаружены пептиды неизвестного происхождения с молекулярной массой от 2072 до 2878 Да и общей аминокислотной последовательностью PSPPLPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPLP. Считается, что эти пептиды играют важную роль в формировании четвертичной структуры БуХЭ, связываясь с С-концевыми доменами ее субъединиц [24]. Показано, что в этой роли может выступать и пролин-богатый N-концевой домен коллагеноподобного белка ColQ – PRAD (proline rich attachment domain): коэкспрессия пептида PRAD, состоящего из 45 а.о., с рекомбинантной БуХЭ в клетках линии СНО приводит к увеличению доли тетрамерной изоформы БуХЭ до 70% [25].

В 2007 году американскому исследователю Huang Y.J. и соавт. удалось создать трансгенных коз, молоко которых содержит рекомбинантную БуХЭ. Показано, что в 1 л молока трансгенных животных обнаруживается от 1 до 5 г активной БуХЭ. Однако полученный таким образом фермент недостаточно гликозилирован, что значительно снижает его фармакологические показатели [26].

В 2010 году группе американских, канадских и израильских ученых удалось экспрессировать БуХЭ в клетках трансгенных растений [27]. После избыточного пэгилирования фармакодинамические характеристики рекомбинантного фермента были сопоставимы с характеристиками БуХЭ плазмы крови человека. К сожалению, применение такого препарата затруднено, поскольку этот способ получения рекомбинантных продуктов в качестве лекарственных средств в настоящее время не разрешен FDA.

Таким образом, на сегодняшний день не существует эффективной и экономически выгодной системы экспрессии рекомбинантной БуХЭ человека. Создание такой системы экспрессии стало целью данной работы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и материалы

В работе использовали реактивы фирм «Panreac», «Amresco» и «Sigma» (США); «Merck» (Германия); наборы для выделения плазмидной ДНК, очистки ПЦР-фрагментов, экстракции ДНК из агарозного геля («Qiagen», США); ферменты рестрикции и ДНК-модифицирующие ферменты («Fermentas», Литва); ростовые среды и компоненты ростовых сред («Gibco», США); векторы pсDNA3.1/Hygro, pBudCE4.1 («Invitrogen», США), pET28a («Novogen», США).

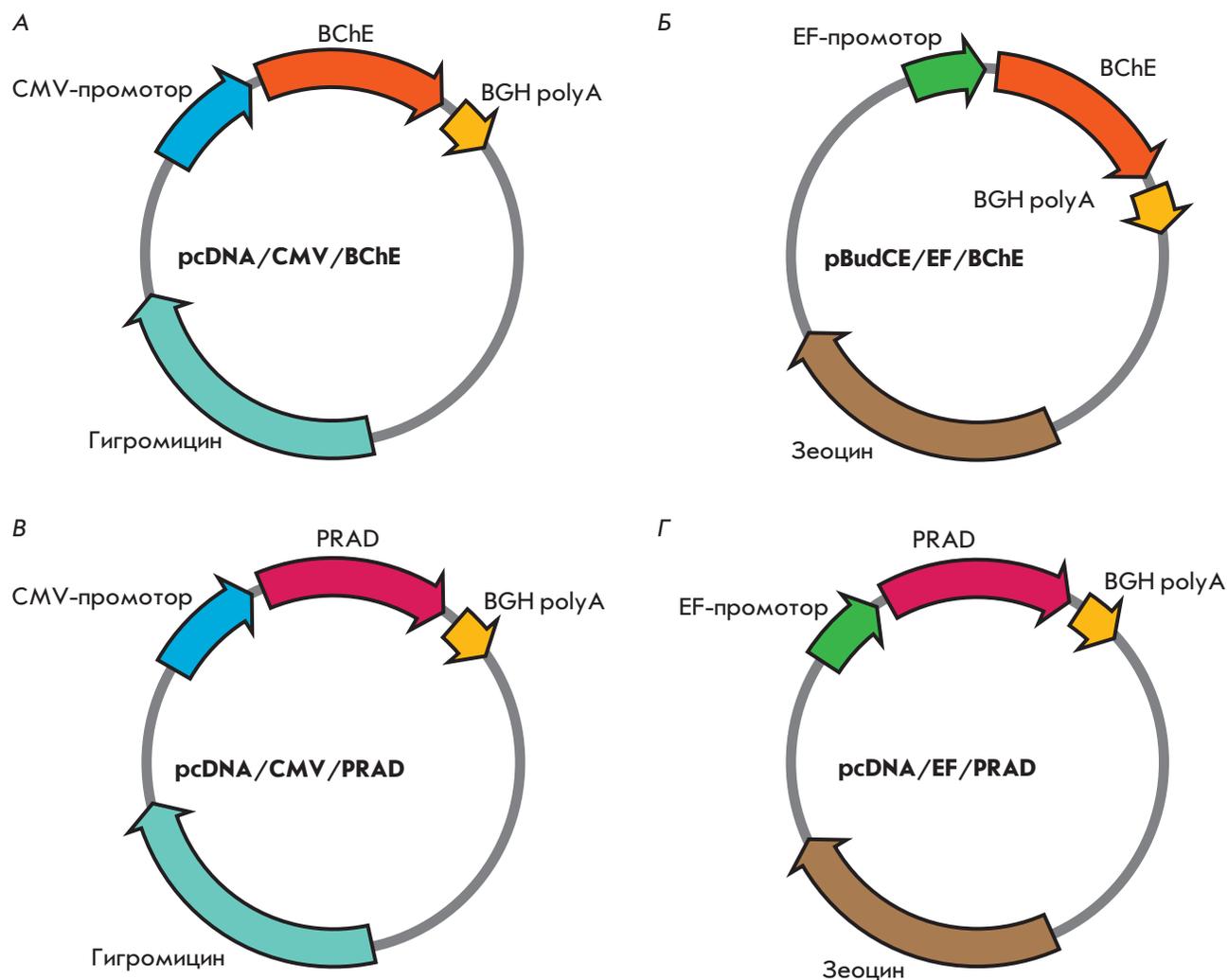


Рис. 1. Схематическое изображение экспрессионных конструкций pcDNA/CMV/BChE (А), pBudCE/EF/BChE (Б), pcDNA/CMV/PRAD (В) и pcDNA/EF/PRAD (Г)

Плазмиды pGS/BChE и pRc/RSV-rQ45 предоставлены П. Массоном (CRSSA, La Tronche, France) и О. Локридж (UNMC, Omaha, USA).

Бактериальные штаммы

В работе использовали штаммы *E. coli* DH5 α , BL21(DE3) и XL2-Blue («Novagen», США).

Клеточные линии

В работе использовали клеточную линию CHO-K1 («Sigma», США) с применением общих методов ведения линий клеток животных [28]. Клетки выращивали в культуральных флаконах или планшетах в среде DMEM, содержащей 10% бычьей фетальной сыворотки и 2 мМ *L*-глутамин, в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂.

Создание экспрессионных конструкций

1) Создание экспрессионной конструкции pcDNA/Hygro/CMV/BChE (рис. 1А).

Плаزمида pGS/BChE, несущая фрагмент ДНК, кодирующий БуХЭ человека, была обработана эндонуклеазами рестрикции HindIII и ApaI. Фрагмент ДНК длиной 1914 п.н. был очищен методом электрофореза в 1% агарозном геле с последующей элюцией с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit и лигирован в расщепленный теми же рестриктазами и дефосфорилированный вектор pcDNA3.1/Hygro.

2) Создание экспрессионной конструкции pBudCE/EF/BChE (рис. 1Б).

Для получения данной конструкции вектор pBudCE4.1 модифицировали. Фрагмент ДНК, со-

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные для клонирования

Праймер 1	TCA AGC CTC AGA CAG TGG TTC
Праймер 2	GAA GAA GCT TGT ACA ATA TGC ATA GCA AAG TCA CAA TC
Праймер 3	AAG TGG TTC CTT TAA TGC TCC T
Праймер 4	ATA TGC GGC CGC TCA TTC TAA GAC ACT TGA TTA TTT CAG T
Праймер 5	ATA TGC TAG CGA AGA TGA CAT CAT AAT TGC AAC A
Праймер 6	ATA TGC GGC CGC TCA CAG AAA CTT GCC ATC ATA AAC ATG
Праймер 7	ATA TGC TAG CGC TCG GGT TGA AAG AGT TAT TGT
Праймер 8	ATA TGC GGC CGC TCA GCA ACC AGT CAA TTT AGC TAA GTT

ответствующий CMV-промотору, удаляли. Таким образом был создан вектор pBudCE/EF. Плазмиду pGS/VChE обрабатывали эндонуклеазой рестрикции BglII. Нужный фрагмент ДНК длиной 1832 п.н. очищали, как описано выше, и лигировали в аналогично рестрицированный и дефосфорилированный вектор pBudCE/EF. Положительные клоны с правильной ориентацией фрагментов определяли методом ПЦР с использованием праймеров 1 и 2 (табл. 1).

3) Создание экспрессионной конструкции pcDNA/CMV/PRAD (рис. 1B).

Плазмиду pRc/RSV-rQ45 [29], содержащую последовательность, кодирующую пептид PRAD и FLAG-эпитоп, обрабатывали эндонуклеазами HindIII и XhoI. Фрагмент длиной 252 п.н. очищали методом электрофореза в 10% ПААГ с последующей электроэлюцией и лигировали в вектор pcDNA3.1/Hygro, соответственно расщепленный и дефосфорилированный.

4) Создание экспрессионной конструкции pcDNA/EF/PRAD (рис. 1Г).

Плазмиду pBudCE/EF, содержащую EF-промотор, обрабатывали эндонуклеазой рестрикции BglII. Рестрицированную ДНК достраивали с помощью фрагмента Клёнова ДНК-полимеразы I, а затем реакционную смесь обрабатывали эндонуклеазой NheI. Фрагмент длиной 1223 п.н. очищали методом электрофореза в 1% агарозном геле с последующей электроэлюцией. Плазмиду pcDNA/CMV/PRAD обрабатывали эндонуклеазой рестрикции HindIII, достраивали с помощью фрагмента Клёнова ДНК-полимеразы I и обрабатывали реакционную смесь эндонуклеазой SpeI. Полученный вектор очищали, как описано выше, дефосфорилировали и лигировали с полученным ранее фрагментом ДНК, соответствующим EF-промотору.

5) Создание экспрессионных конструкций pET28-C, pET28-N1 и pET28-N2 (рис. 3А).

Нуклеотидные последовательности, кодирующие С-концевой фрагмент БуХЭ (322 а.о.), а также два

фрагмента N-концевого пептида БуХЭ – N1 и N2 (133 и 119 а.о. соответственно), получены методом ПЦР. В качестве матрицы использовали плазмиду pGS/VChE. В реакцию брали следующие пары праймеров: фрагмент С – праймеры 3 и 4; фрагмент N1 – праймеры 5 и 6; фрагмент N2 – праймеры 7 и 8 (табл. 1). ПЦР-продукты С, N1 и N2 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NheI и NotI и лигировали аналогичным образом рестрицированный и дефосфорилированный вектор pET28a с получением экспрессионных конструкций pET28-C, pET28-N1 и pET28-N2 соответственно.

Лигазными смесями трансформировали электрокомпетентные клетки *E. coli* штамма DH5 α или XL2-Blue. Первичный скрининг клонов проводили при помощи ПЦР с колоний. Плазмиды, выделенные из позитивных клонов, дополнительно охарактеризовывали методом рестрикционного анализа. Правильность сборки экспрессионных конструкций и векторов проверяли секвенированием по Сэнгеру. Приготовление электрокомпетентных клеток, трансформацию, обработку рестриктазами, лигирование, ПЦР и электрофорез ДНК проводили по стандартным методикам [30, 31]. Плазмиды выделяли согласно [32].

Экспрессия и очистка рекомбинантных пептидов БуХЭ

Клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) трансформировали методом электропорации конструкциями pET28-C, pET28-N1 или pET28-N2. Пептиды БуХЭ, кодируемые плазмидами, содержали шесть остатков гистидина на С-конце, что позволило выделять их с помощью металлохелатной хроматографии.

Клетки наращивали при 37°C до $OD_{600} = 0.6$, после чего индуцировали раствором изопрропилтио- β -D-галактозида (ИПТГ), добавленным до концентрации 1 мМ. Через 6 ч после индукции клетки центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин, осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 50 мМ Трис-

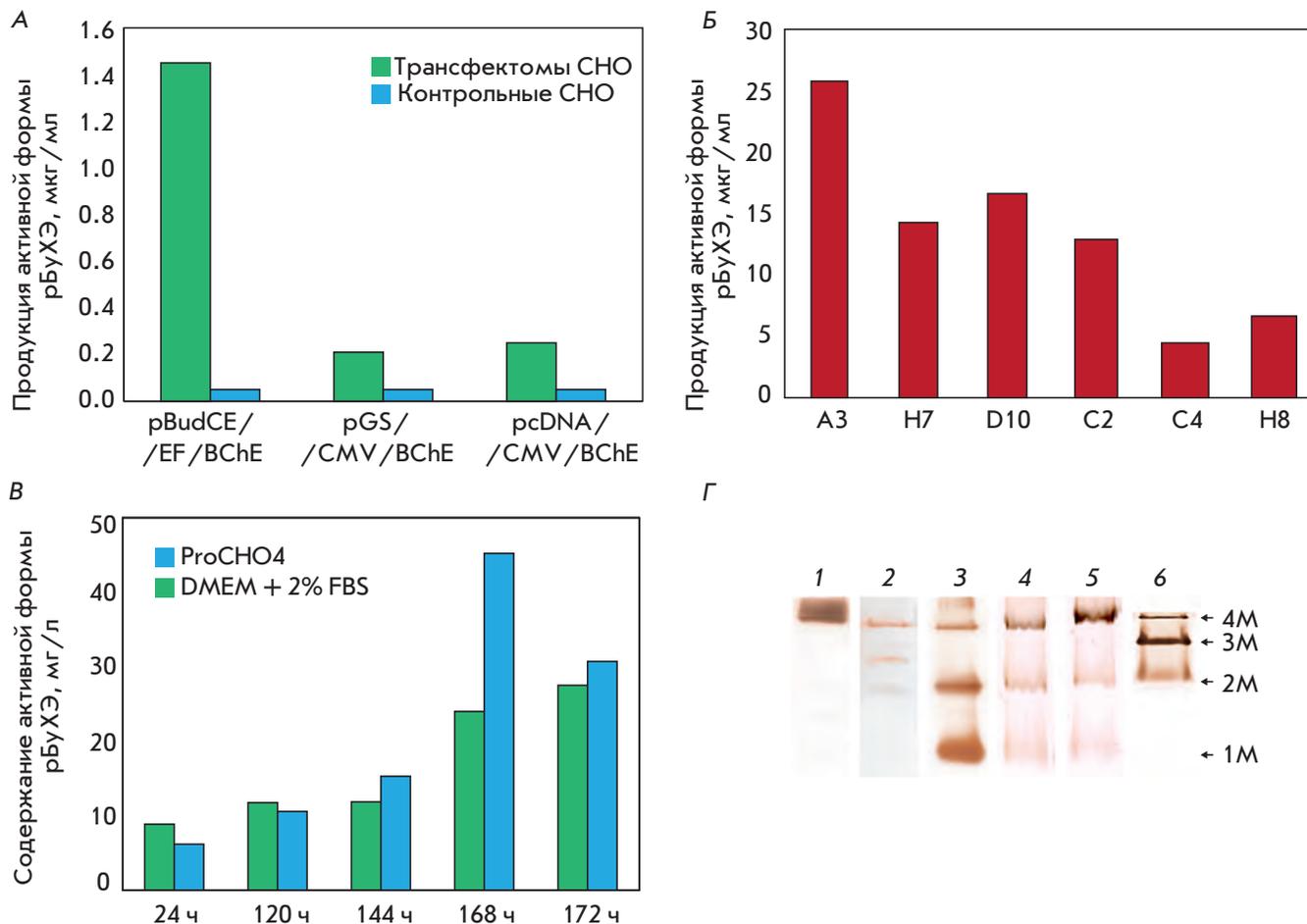


Рис. 2. Анализ эффективности временной трансфекции клеток линии CHO экспрессионными конструкциями pBudCE/EF/BChE, pGS/CMV/BChE и pcDNA/CMV/BChE (А). Сравнительный анализ продукции БуХЭ отобранными моноклонами после стабильной трансфекции клеток линии CHO линейаризованной конструкцией pBudCE/EF/BChE (Б). Анализ подбора условий экспрессии рекомбинантной БуХЭ человека клоном А3 в различных ростовых средах (В). Анализ олигомерного состава рБуХЭ методом Карновского. Разделение БуХЭ осуществляли в 8% ПААГ в неденатурирующих условиях. 1 – Образец плазмы крови человека, 2 – образец очищенной бутирилхолиэстеразы плазмы крови человека, 3 – культуральная среда клона А3, 4 – культуральная среда клона А3 после временной трансфекции конструкцией pcDNA/CMV/PRAD, 5 – культуральная среда клона А3 после временной трансфекции конструкцией pcDNA/EF/PRAD, 6 – культуральная среда клона А3Н9; 4М – тетрамер, 3М – тример, 2М – димер, 1М – мономер (Г)

HCl pH 8.0, 2 mM EDTA, 0.1% Тритон X-100, в объеме, равном 0.1 от исходного.

Все рекомбинантные полипептиды БуХЭ экспрессировались в нерастворимой форме. Для получения фракции телец включения в суспензию клеток вносили лизоцим до конечной концентрации 0.1 мг/мл и инкубировали при 30°C и постоянном помешивании в течение 15 мин, после этого к лизату добавляли MgCl₂ до концентрации 8 mM и ДНКазу до 0.1 мг/мл. Лизат клеток центрифуги-

ровали в течение 15 мин при 13000 об/мин. Осадок, содержащий фракцию нерастворимых белков, последовательно отмывали в растворах, содержащих 50 mM Трис-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Тритон X-100; 50 mM Трис-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 М мочевины и 50 mM Трис-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 8 М мочевины. Полученные фракции анализировали методом белкового электрофореза в 15% ПААГ в восстанавливающих условиях. Полипептиды С и N1 обнаруживались во фракции, содержащей 2

М мочевины, полипептид N2 – в нерастворимой фракции белков.

Затем полипептиды С и N1 очищали с помощью металлохелатной хроматографии в денатурирующих условиях на смоле IMAC Sepharose 6FF («GE Healthcare», США) по методике производителя. Элюаты диализовали против воды, полученной на установке mQ («Millipore», США), осадок осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 50% водном растворе этилового спирта до получения мелкодисперсной суспензии.

Полипептид N2 очищали многократной отмывкой нерастворимой фракции раствором, содержащим 50 мМ Трис-НСl рН 8.0, 150 мМ NaCl, 8 М мочевины, 1 мМ β-меркаптоэтанола. Осадок диализовали против воды, полученной на установке mQ («Millipore», США), осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 50% водном растворе этилового спирта до получения мелкодисперсной суспензии.

Иммунизация мышей полноразмерной БуХЭ плазмы крови человека

Мыши линии BALB/c были получены из питомника Harlan (Великобритания) и содержались в виварии Филиала Института биоорганической химии РАН в г. Пущине в стерильных условиях, минимизирующих контакт иммунной системы с внешними антигенами (Specific Pathogen-Free-статус). Возраст мышей варьировал от 6 до 8 нед. Иммунизацию проводили, вводя каждой мыши 100 мкг БуХЭ в полном адъюванте Фрейнда дважды с недельным интервалом. Бустирование иммунизированных мышей проводили интраперитонеально за 3 дня до отбора спленоцитов, вводя мышам по 50 мкг БуХЭ в фосфатно-солевом буфере (PBS).

Получение моноклональных антител мыши

Моноклональные антитела получали по стандартным методикам с использованием клеточных гибридом и асцитом [33, 34]. Моноклональные антитела очищали с помощью аффинной хроматографии на смоле HiTrap Protein-A («GE Healthcare», США) согласно методике производителя. Биотинилирование антител проводили с помощью NHS-биотина («GE Healthcare», США) по методике производителя.

Иммунизация кроликов рекомбинантными полипептидами БуХЭ

Иммунизацию кроликов проводили на базе вивария ИБХ РАН. Рекомбинантные полипептиды N1 и N2 БуХЭ вводили подкожно по следующей схеме: первая инъекция – суспензия пептида в полном адъюванте Фрейнда; вторая инъекция (через 28 дней) – суспензия пептида в неполном адъюванте Фрейнда;

третья инъекция (через 14 дней) – суспензия пептида в неполном адъюванте Фрейнда. Каждому животному вводили по 200 мкг пептида в каждой инъекции. Через 7 дней после иммунизации из ушной вены каждого животного отбирали 10 мл крови и получали сыворотку крови. Титр антител определяли методом непрямого ИФА.

Иммуноферментный анализ методом ELISA

В работе использовали различные варианты иммуноферментного анализа с применением стандартных протоколов тестирования [33, 34].

1) Непрямой ИФА использовали для определения титра антител. С этой целью на 96-луночные планшеты MaxiSorp («Nunc», США) сорбировали очищенную БуХЭ плазмы крови человека, и далее вносили моноклональные антитела к БуХЭ в различных разведениях, или на планшетах сорбировали пептиды БуХЭ человека, и затем вносили моноклональные антитела или поликлональные сыворотки кроликов в различных разведениях; комплекс детектировали с помощью антивидовых антител козы, конъюгированных с пероксидазой хрена.

2) Конкурентный ИФА использовали для поиска пары моноклональных антител к БуХЭ человека. Для этого на 96-луночные планшеты MaxiSorp («Nunc», США) сорбировали БуХЭ плазмы крови человека, а затем инкубировали с моноклональными антителами к БуХЭ в различных разведениях в присутствии 10 нг/мл биотинилированного моноклонального антитела 4С6D8. Взаимодействие детектировали с помощью конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена. Стартовая концентрация исследуемых антител составляла 100 нг/мл.

3) «Сандвич» ИФА проводили для определения концентрации БуХЭ. На 96-луночные планшеты MaxiSorp («Nunc», США) сорбировали моноклональные антитела 4С6D8 и инкубировали с образцами БуХЭ, денатурированными при различных условиях (рис. 3Б). Взаимодействие детектировали при помощи поликлональной сыворотки кроликов к полипептиду N1 БуХЭ (титр 1 : 1000). Проявляли с помощью антивидовых антител козы, конъюгированных с пероксидазой хрена.

Трансфекция эукариотических клеток методом липофекции

Перед проведением трансфекции плазмидные ДНК, предварительно линеаризованные эндонуклеазой рестрикции PvuI или BglII (в случае конструкции pcDNA/EF/PRAD), дополнительно очищали от примесей и солей. Липофекцию проводили с использованием Lipofectamine™ Reagent и Plus™ Reagent («Invitrogen», США) согласно рекомендации производителя.

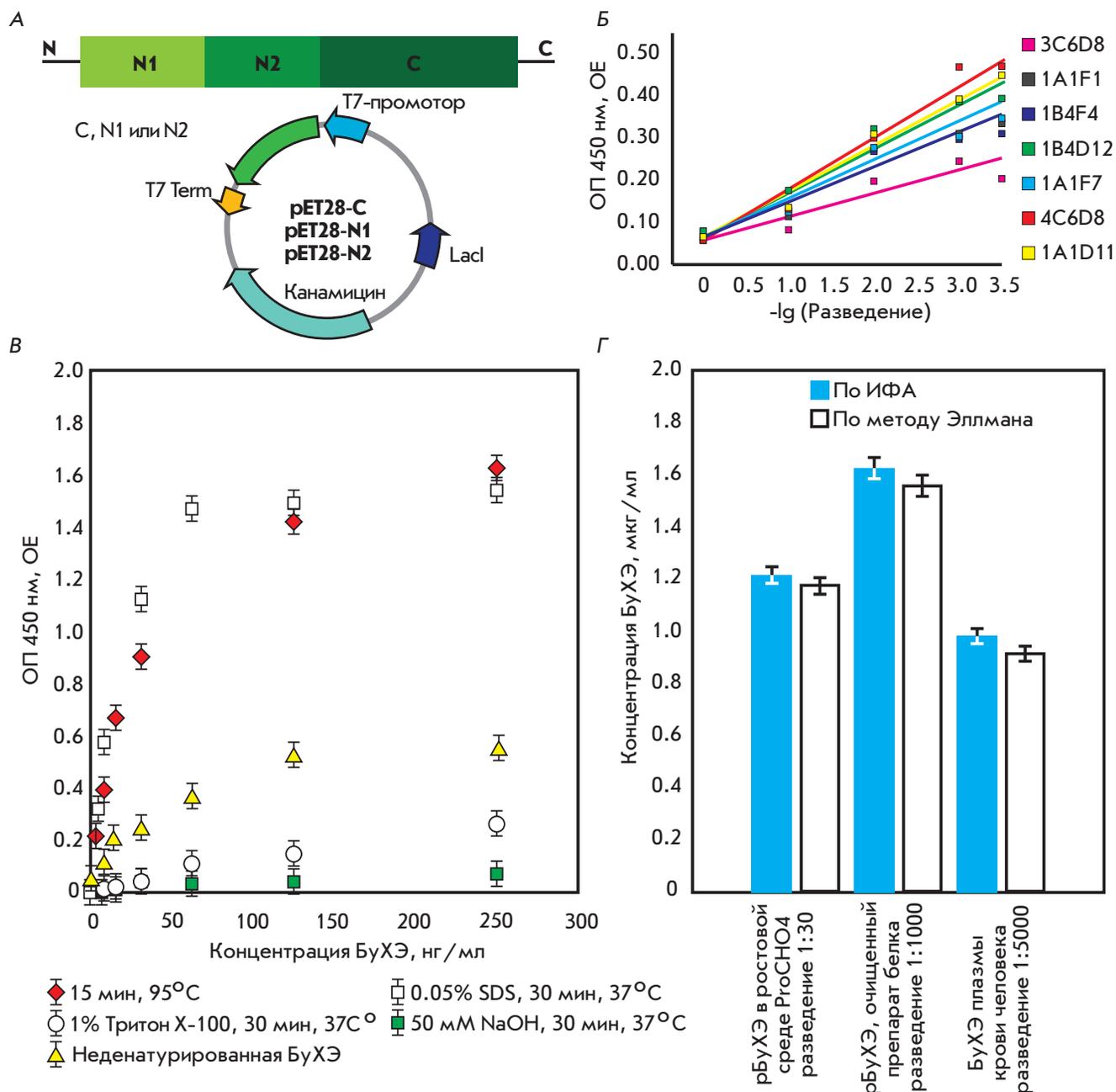


Рис. 3. Фрагменты, кодирующие С-концевой, N1- и N2-полипептиды БуХЭ, и экспрессионные конструкции рЕТ28-С, рЕТ28-N1, рЕТ28-N2 (А). Анализ взаимодействия моноклональных антител с полноразмерной БуХЭ методом конкурентного ИФА. На оси абсцисс указан обратный десятичный логарифм разведения исследуемых антител (стартовая концентрация 100 нг/мл); концентрация биотинилированного антитела 4С6D8 оставалась неизменной и составляла 10 нг/мл. Проявляли конъюгатом стрептавидина с пероксидазой хрена (Б). Анализ способов денатурации антигена для определения концентрации бутирилхолинэстеразы методом «сэндвич» ELISA на примере моноклонального антитела 4С6D8. Методика ИФА описана в разделе «Экспериментальная часть» «сэндвич» ELISA и Элмана (Г)

Экспрессия рекомбинантной БуХЭ клетками линии СНО

Клетки выращивали в среде DMEM, содержащей 2% бычьей фетальной сыворотки и 2 мМ L-глутамина, в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ во флаконах (25 см²). По достижению клетками 50–70% конfluenceности отбирали кондиционную ростовую среду и промывали клетки равным объемом стерильного 1 × PBS, после чего добавляли равный объем безбелковой ростовой среды Reprotech («Reprotech», США), EX-Cell («Sigma», США) или ProCHO4 («Lonza», Швейцария). Далее клетки инкубировали в безбелковой ростовой среде в течение 5 сут при 37°C и 5% CO₂. Каждые 24 ч отбирали пробу среды для определения содержания активной формы БуХЭ методом Элмана.

Определение содержания активной формы фермента БуХЭ человека методом Элмана [35]

Культуральную жидкость (50 мкл) смешивали со 100 мкл стерильного 1 × PBS, 100 мкл полученного раствора переносили в лунку 96-луночного планшета. В качестве контроля для построения калибровочной кривой использовали БуХЭ из плазмы крови человека («Sigma», США). Перед началом измерения в лунки с образцами и контролями вносили 100 мкл раствора 50 мкМ дитионитробензойной кислоты и 100 мкМ бутирилтиохолинйодида в 1 × PBS. Измерения проводили на приборе TECAN GENios при длине волны 405 нм.

Очистка рекомбинантной БуХЭ человека из ростовой среды

Ростовую среду от клеток линии СНО центрифугировали при 800 g в течение 5 мин для удаления клеток, а затем при 3500 g в течение 15 мин для удаления клеточного дебриса. Супернатант фильтровали через мембраны Millipore HPWH с диаметром пор 0.22 мкм для удаления остатков примесей. Очищенный супернатант 3 раза концентрировали на мембранах Pellicon PLCTK30 («Millipore», США) с последующим разведением буфером нанесения (50 мМ калий-фосфатный буфер pH 7.2, 1 мМ EDTA). Полученный концентрат среды наносили на аффинную смолу Procainamide-Sepharose 4B [4] в режиме рециркуляции на скорости 0.5 мл/мин в течение ночи при +4°C. Рекомбинантную БуХЭ элюировали со смолы градиентом NaCl (0–500 мМ) 15 объемами колонки при скорости потока 0.5 мл/мин. Полученную фракцию белка концентрировали на мембранах Centricon 10 («Millipore»), после чего дополнительно очищали методом гель-фильтрации на колонке Superdex 200 («GE Healthcare»).

Определение содержания изоформ БуХЭ методом Карновского [36]

Электрофоретическое разделение белков в нативных условиях проводили по стандартной методике Лэммли [31] с незначительными модификациями. Для приготовления геля использовали водный стоковый раствор с соотношением акриламид–N,N,N',N'-метилен-бисакриламид = 29 : 1. Концентрирующий (верхний) 4% гель готовили в 0.125 М Трис-НСl, pH 6.9. Разделяющий (нижний) 8% гель готовили в 0.125 М Трис-НСl, pH 8.8. Электрофоретическое разделение проводили в буфере, содержащем 50 мМ глицина, 5 мМ Трис-НСl pH 8.0. Пробы наносили в буфере, содержащем 10% глицерин, 0.2 М Трис-НСl pH 7.5. Электрофорез в концентрирующем геле проводили при силе тока 8–10 мА на одну пластину геля, а в разделяющем геле – при 15–20 мА. После разделения белков в неденатурирующем ПААГ пластину с гелем переносили в раствор, содержащий 125 мМ NaOH, 125 мМ малеиновой кислоты, 11.6 мМ цитрата натрия, 10 мМ CuSO₄, 550 мкМ гексацианоферрата(III) калия и 2 мМ бутирилтиохолинйодида. Гель инкубировали в растворе в течение 3–8 ч при комнатной температуре на орбитальном шейкере.

Определение кинетических констант рекомбинантной БуХЭ методом Элмана

Для определения кинетических констант использовали модифицированную реакцию Элмана. Известное количество БуХЭ вносили в раствор, содержащий 1 мМ дитионитробензойную кислоту в 0.1 М калий-фосфатном буфере pH 7.2, концентрация бутирилтиохолинйодида варьировала от 10 мкМ до 1 мМ. Количество активных центров БуХЭ определяли титрованием с диизопропилфторфосфатом (ДФФ). Реакцию проводили при 25°C, оптическое поглощение измеряли при 412 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка системы экспрессии рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека

Целью нашей работы было создание эффективной системы экспрессии рекомбинантной БуХЭ человека. Поскольку препарат БуХЭ планируется использовать в качестве средства профилактики и терапии отравлений ФОТ, мы выбрали клетки линии СНО как хорошо изученную и одобренную FDA систему экспрессии рекомбинантных белков.

Для выбора промотора, обеспечивающего наиболее эффективную продукцию БуХЭ, клетки линии СНО были трансфицированы методом липофекции кольцевой плазмидной ДНК конструкций pGS/VChE [37], pcDNA/CMV/VChE (рис. 1А)

и pBudCE/EF/VChE (рис. 1Б), несущих ген бутирил-холинэстеразы человека под контролем различных промоторов. Через 48 и 72 ч после липофекции образцы культуральной среды отбирали для определения содержания активной формы БуХЭ методом Элмана. В качестве контроля использовали кондиционные среды клеток линии СНО, выращенных в тех же условиях, что и трансфектомы. Из результатов, представленных на рис. 2А, видно, что уровень экспрессии конструкций pGS/CMV/VChE и pсDNA/CMV/VChE был сопоставимым и составил около 0.2 мкг/мл, тогда как у pBudCE/EF/VChE он оказался почти на порядок выше (1.45 мкг/мл). Таким образом, конструкция pBudCE/EF/VChE, содержащая ген БуХЭ под контролем промотора EF-1 (фактор элонгации 1), оказалась наиболее перспективной.

Плазмидную ДНК конструкции pBudCE/EF/VChE линейаризовали и трансфицировали методом липофекции в клетки линии СНО для получения стабильно экспрессирующего клона. Через 72 ч после липофекции клетки рассеивали на 24-луночные планшеты из расчета 1 : 12 для получения стабильных трансфектом. Селекцию проводили с использованием зеоцина, который добавляли в ростовую среду в концентрации 600 мкг/мл. После селекции и анализа клетки рассеивали на 96-луночные планшеты для получения моноклонов. Продукцию активной формы БуХЭ на всех этапах определяли по методу Элмана. После сравнительного анализа экспрессии БуХЭ в одинаковых условиях наиболее перспективными моноклонами (рис. 2Б), а также проверки стабильности продукции БуХЭ этими клонами на протяжении пяти поколений пересеванием на 25 см² флаконах, для дальнейшей работы отобрали клон А3. Следующим шагом стала адаптация этого клона к продукции БуХЭ на специальных безбелковых средах.

Был протестирован ряд сред, включая Reprotech («Reprotech»), EX-Cell («Sigma») и ProCHO4 («Lonza», Швейцария). Для подбора условий экспрессии клетки клона А3 предварительно наращивали в среде DMEM, содержащей 2% бычьей фетальной сыворотки (FBS). По достижению клетками 70–90% конfluентности среду заменяли на одну из тестируемых безбелковых сред и инкубировали в ней клетки на протяжении нескольких суток. Инкубация в средах Reprotech и EX-Cell приводила к гибели клеток на 1–2 сут. Эти среды были признаны неподходящими для данного моноклона. При инкубации клеток в среде ProCHO4 наблюдался значительный прирост продукции рБуХЭ к 96 ч инкубации (4 сут) (рис. 2В). Падение активности рБуХЭ на 5-е сут, вероятно, обусловлено протеолитической активностью вследствие гибели клеток.

Анализ олигомерного состава рБуХЭ, продуцируемой клоном А3/СНО, по методу Карновского (рис. 2Г, 3) показал, что рБуХЭ в основном представлена в форме мономера, а содержание тетрамерной формы невелико. С фармакологической точки зрения именно тетрамер БуХЭ представляет интерес, поскольку время полувыведения тетрамера из организма составляет 3–4 дня, а мономера – несколько часов [4]. Ранее было показано, что при коэкспрессии БуХЭ и пептида PRAD – домена коллагеноподобного белка ColQ – количество тетрамеризованного продукта увеличивается [37]. Кроме того, добавление в ростовую среду химически синтезированного пептида, входящего в состав БуХЭ, также способствует тетрамеризации рекомбинантного белка [24]. Пептиды PRAD и пролин-богатый пептид БуХЭ очень похожи по структуре и, следовательно, могут обладать близкими свойствами. Однако синтез пептидов, содержащих несколько остатков пролина подряд, сложен, имеет невысокий выход и невыгоден в условиях биотехнологического производства, поэтому мы решили использовать коэкспрессию БуХЭ и пептида PRAD под контролем различных промоторов. Для этого экспрессионные конструкции pсDNA/CMV/PRAD (рис. 1В) и pсDNA/EF/PRAD (рис. 1Г), несущие PRAD под контролем EF- или CMV-промотора, трансфицировали методом липофекции в клетки клона А3. Через 72 ч после трансфекции количество тетрамерной формы БуХЭ в среде контролировали электрофоретически по методу Карновского. По результатам анализа (рис. 2Г, 4, 5) были выбраны клетки клона А3, трансфицированные плазмидой pсDNA3.1/EF/PRAD. Использование EF-промотора в данном случае позволяет получать клетки, продуцирующие большее количество тетрамерной формы БуХЭ. Экспрессионную конструкцию pсDNA/EF/PRAD линейаризовали эндонуклеазой рестрикции BglII и трансфицировали методом липофекции в клетки клона А3 для получения стабильных клонов-продуцентов. Селекцию проводили, добавляя в ростовую среду 1.5 мг/мл гигромицина Б и 600 мкг/мл зеоцина. После селекции и анализа клетки рассеивали на 96-луночные планшеты для получения моноклонов. Продукцию изоформ БуХЭ моноклонами определяли по методу Карновского, и по результатам тестирования был отобран клон А3Н9. После оптимизации условий экспрессии в ростовой среде ProCHO4 («Lonza») по ранее описанной схеме удалось получить стабильно продуцирующий клон А3Н9, характерной особенностью которого является продукция тетрамерной и димерной форм БуХЭ при полном отсутствии мономера (рис. 2Г, 6).

Таблица 2. Очистка рекомбинантной БуХЭ из ростовой среды

Стадия выделения	Общая активность БуХЭ, ед. акт.	Выход, %	Общее количество БуХЭ, мг	Удельная активность, ед. акт./мг
Ростовая среда	915	100	2.03	451
Концентрат среды	890	97	1.96	454
Элюат со стадии аффинной хроматографии	825	90	1.81	456
Гель-фильтрация, фракция 21 мин	650	71.5	1.41	461

Разработка системы детекции и оценки продукции рекомбинантного белка

В ходе работы оценку эффективности трансфекции и отбор клонов клеток линии СНО, продуцирующих рекомбинантную БуХЭ, проводили по функциональной активности фермента, с применением методик Эллмана [35] и Карновского [36]. В основе этих методик лежит способность БуХЭ гидролизовать бутирилтиохолин, что делает их неприменимыми в случаях, когда БуХЭ неактивна или ингибирована [38, 39].

Известно, что высокий уровень экспрессии рекомбинантных продуктов в клетках эукариот иногда сопровождается снижением их удельной активности, т.е. появлением некоторой доли неактивного белка. Часто это связано с тем, что собственная система посттрансляционных модификаций клетки не справляется с объемом продуцируемого белка, поэтому появляются неактивные продукты с неправильным фолдингом, неотщепленным пропептидом и другими дефектами. Подобные проблемы удается разрешить при коэкспрессии продукта с необходимыми шаперонами или ферментами, вовлеченными в посттрансляционные модификации [40–44]. В связи с этим представлялось интересным оценить удельную активность нашего фермента при экспрессии.

Таким образом, перед нами возникла необходимость разработать систему прямой оценки содержания БуХЭ в образцах. Эту систему планировалось применять для характеристики рекомбинантной БуХЭ, количественного выявления неактивной БуХЭ в ростовой среде, а также для определения удельной активности фермента в процессе выделения и хроматографической очистки. Для определения концентрации белка в образцах наиболее простым и информативным является метод ИФА в формате «сэндвич» ELISA. Анализ коммерчески доступных антител к БуХЭ человека показал, что на сегодняшний день не существует пары неконкурирующих моноклональных антител с возможностью применения в ИФА по типу «сэндвич».

Последовательности, соответствующие С- и N-концевым фрагментам БуХЭ (рис. 3А): С (322 а.о.), N1 и N2 (133 и 119 а.о.), были наработаны в прокариотической системе экспрессии и очищены. Моноклональные антитела 3С6D8, 1А1F1, 1В4F4, 1В4D12, 1А1F7, 4С6D8 и 1А1D11 к полноразмерной БуХЭ человека были получены по стандартной методике [33]. Методом конкурентного ИФА было показано, что все антитела взаимодействуют с С-концевым участком БуХЭ, причем конкурируют друг с другом (рис. 3В). Вестерн-гибридизация с фрагментами БуХЭ подтвердила результаты ELISA (данные не приведены). Для преодоления возникшей проблемы были получены поликлональные сыворотки кроликов с использованием в качестве антигенов рекомбинантных полипептидных фрагментов N1 и N2 БуХЭ. Методом ИФА в сыворотках выявлен одинаковый титр антител к обоим N-концевым фрагментам БуХЭ, однако с полноразмерной БуХЭ лучше связывались антитела к полипептиду N1. Несмотря на высокий уровень специфического взаимодействия антител с БуХЭ в непрямом ИФА, максимальный уровень сигнала в формате «сэндвич» ELISA не превышал 0.6 ОЕ. Мы предположили, что частичная денатурация антигена увеличит доступность эпитопов и повысит тем самым чувствительность метода. Из опробованных методов денатурации БуХЭ (нагревание, добавление детергентов, щелочи) наиболее эффективной оказалась инкубация в течение 15 мин при 95°C (рис. 3В). По результатам анализов из панели моноклональных антител выбрали антитело 4С6D8, проявившее максимальную чувствительность в комбинации с поликлональными кроличьими антителами к N1-полипептиду.

В итоге был разработан количественный метод определения содержания БуХЭ в образцах культуральной среды, очищенных препаратах, а также в плазме крови человека. Сравнение определенной этим методом концентрации БуХЭ в образцах, с результатами, полученными по методике Эллмана, показало, что ферментативной активностью облада-

Таблица 3. Кинетические константы гидролиза бутирилхолинйодида рекомбинантной БуХЭ и БуХЭ из плазмы крови человека

Константа	рБуХЭ	БуХЭ плазмы крови [37]
K_M , мкМ	25 ± 1	23 ± 2
k_{cat} , мин ⁻¹	49200 ± 800	39900 ± 1800
K_{ss} , мкМ	250 ± 30	140 ± 20
b	2.4 ± 0.2	2.5 ± 0.1

ют более 95% БуХЭ, экспрессируемой клоном АЗН9 в ростовую среду (рис. 3Г).

Выделение и функциональный анализ очищенного препарата рБуХЭ

Для изучения функциональной активности рБуХЭ очистили из ростовой среды. Разработанный протокол очистки включал стадии ультрафильтрации, концентрирования, аффинной очистки и гель-фильтрации. На каждой стадии очистки отбирали образец, в котором анализировали содержание активной формы БуХЭ методом Элмана и оценивали количество белка методом ELISA. Данные анализа представлены в табл. 2. Конечный выход белка, полученного с чистотой 95% (по данным электрофореза), составил около 70%.

Кинетические параметры очищенного препарата рекомбинантной БуХЭ определяли в диапазоне концентраций субстрата от 10 до 1000 мкМ при концентрации фермента 5 нМ. На основании этих данных рассчитывали индивидуальные кинетические параметры реакции гидролиза (табл. 3). Сравнение кинетических констант рБуХЭ и БуХЭ из плазмы крови человека показало, что величины K_M одинаковы в пределах ошибки расчетов и составляют 25 и 23 мкМ [37] соответственно, а константы k_2 (49200 и 39900 мин⁻¹ соответственно) лишь незначительно различаются, что, по-видимому, связано со способами определения концентрации активных центров изучаемых ферментов. Известно также, что для бутирилхолинэстеразы, полученной из плазмы крови человека, характерна активация субстратом в реакциях с соединениями холинового ряда. Аналогичный эффект наблюдается и в случае гидролиза бутирилхолинйодида рекомбинантной БуХЭ при концентрациях субстрата больше 500 мкМ. Это

позволило рассчитать константу K_{ss} и параметр b . Для рекомбинантной БуХЭ параметр b отличался от литературного значения 2.5 ± 0.1 [37] в пределах ошибки и составил 2.4 ± 0.27 . Таким образом, можно сделать вывод, что полученная рекомбинантная БуХЭ функционально активна, и организация активного центра одинакова у рекомбинантного и природного фермента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований удалось разработать эффективную систему экспрессии активной бутирилхолинэстеразы человека в клетках линии СНО. Использование промотора EF-1 позволило значительно увеличить продукцию рекомбинантного белка клетками – с 3–5 до 40 мг/л. Рассчитанные кинетические константы свидетельствуют об интактности активного центра фермента. Анализ изоформ рБуХЭ в ростовой среде показал, что фермент продуцируется преимущественно в форме димера и тетрамера.

Разработанная методика ИФА позволила количественно оценить содержание БуХЭ в образцах культуральной среды, очищенных препаратах, а также в плазме крови человека. Сравнение величин концентрации БуХЭ в образцах с данными, полученными по методике Элмана, показало, что более 95% БуХЭ, экспрессируемой клоном АЗН9 в ростовую среду, является активной, и в процессе очистки препарата удельная активность рБуХЭ не снижается.

На следующем этапе работы предполагается дальнейшее улучшение фармакодинамических характеристик рекомбинантного фермента с помощью химических модификаций, таких, как, например, пегилирование [45] или сиамирование [46]. ●

Авторы выражают благодарность проф. Оксане Локридж (Oksana Lockridge, UNMC, Omaha, USA) за предоставленные для работы конструкции рGS/CMV/BChE и рRc/RSV-rQ45.

Работа поддержана РФФИ (грант № 10-04-00673-а), ФЦП (государственный контракт № 2046.2012.4) научной школы «Химические основы биокатализа», Программой Президиума РАН № 24 «Нанотехнологии и наноматериалы» и Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере – программа «УМНИК».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jbilo O., L'Hermite Y., Talsa V., Toutant J.P., Chatonnet A. // Eur. J. Biochem. 1994. V. 225. P. 115–124.

2. Mesulam M. // Neuroscience. 2002. V. 110. P. 627–639.
3. Saxena A., Sun W., Fedorko J.M., Koplovitz I., Doctor B.P. // Biochem. Pharmacol. 2011. V. 81. P. 164–169.

4. Lockridge O., Schopfer L.M., Winger G., Woods J.H. // *J. Med. Chem. Biol. Radiol. Def.* 2005. V. 3. P. 1–23.
5. Raveh L. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997. V. 145. P. 43–53.
6. Masson P., Rochü D. // *Acta Naturae.* 2009. V. 1. № 1. P. 68–78.
7. Masson P., Nachon F., Broomfield C.A., Lenz D.E., Verdier L., Schopfer L.M., Lockridge O. // *Chem. Biol. Interact.* 2008. V. 175. P. 273–280.
8. Lockridge O., Bartels C.F., Vaughan T.A., Wong C.K., Norton S.E., Johnson L.L. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 549–557.
9. Lenz D.E., Yeung D., Smith J.R., Sweeney R.E., Lumley L.A., Cerasoli D.M. // *Toxicology.* 2007. V. 233. P. 31–39.
10. Masson P., Carletti E., Nachon F. // *Protein Pept. Lett.* 2009. V. 16. P. 1215–1224.
11. Geyer B.C., Kannan L., Cherni I., Woods R.R., Soreq H., Mor T.S. // *Plant Biotechnol. J.* 2010. V. 8. P. 873–886.
12. Masson P., Adkins S., Pham-Trong P., Lockridge O. // *Multidisciplinary approaches to cholinesterase functions. Expression and refoldin of functional human butyrylcholinesterase in E. coli.* N.Y.: Plenum Press, 1992.
13. Kishnani P.S., Corzo D., Nicolino M., Byrne B., Mandel H., Hwu W.L., Leslie N., Levine J., Spencer C., McDonald M., et al. // *Neurology.* 2007. V. 68. P. 99–109.
14. 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. // *N. Engl. J. Med.* 1990. V. 323. P. 1800–1805.
15. White G.C., Beebe A., Nielsen B. // *Thromb. Haemost.* 1997. V. 78. P. 261–265.
16. Jacobs L.D., Cookfair D.L., Rudick R.A., Herndon R.M., Richert J.R., Salazar A.M., Fischer J.S., Goodkin D.E., Granger C.V., Simon J.H., et al. // *Ann. Neurol.* 1996. V. 39. P. 285–294.
17. Barngrover D. // *J. Biotechnol.* 2002. V. 95. P. 280–282.
18. Tabuchi H., Sugiyama T., Tanaka S., Tainaka S. // *Biotechnol. Bioeng.* 2010. V. 107. P. 998–1003.
19. Porter A.J., Dickson A.J., Racher A.J. // *Biotechnol. Progr.* 2010. V. 26. P. 1446–1454.
20. Strnad J., Brinc M., Spudić V., Jelnikar N., Mirnik L., Carman B., Kravanja Z. // *Biotechnol. Progr.* 2010. V. 26. P. 653–663.
21. Mizushima S., Nagata S. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 5322.
22. Boshart M., Weber F., Jahn G., Dorsch-Häsler K., Fleckenstein B., Schaffner W. // *Cell.* 1985. V. 41. P. 521–530.
23. Nachon F., Nicolet Y., Viguié N., Masson P., Fontecilla-Camps J.C., Lockridge O. // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. P. 630–637.
24. Li H., Schopfer L.M., Masson P., Lockridge O. // *Biochem. J.* 2008. V. 411. P. 425–432.
25. Altamirano C.V., Lockridge O. // *Biochemistry.* 1999. V. 38. P. 13414–13422.
26. Huang Y.-J., Huang Y., Baldassarre H., Wang B., Lazaris A., Leduc M., Bilodeau A.S., Bellemare A., Côté M., Herskovits P., Touati M., Turcotte C., Valeanu L., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 13603–13608.
27. Geyer B.C., Kannan L., Garnaud P.-E., Broomfield C.A., Cadieux C.L., Cherni I., Hodgins S.M., Kasten S.A., Kelley K., Kilbourne J., Oliver Z.P., Otto T.C., Puffenberger I., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 20251–20256.
28. Freshney R.I. *Culture of animal cells.* Oxford, N.Y.: Wiley-Blackwell, 2005. P. 642.
29. Duysen E.G., Bartels C.F., Lockridge O. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002. V. 302. P. 751–758.
30. Sambrook J., Russell D.W. *Molecular Cloning.* Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001.
31. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
32. Schlesinger N., Baker D.G., Schumacher H.R. // *J. Rheumatol.* 1997. V. 24. P. 1018–1019.
33. Harlow E., Harlow E., Lane D. *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1988.
34. Ausubel F.M. // *Current Protocols.* 2002. Unit 2.7.
35. Ellman G.L., Courtney K.D., Anders V., Feather-Stone R.M. // *Biochem. Pharmacol.* 1961. V. 7. P. 88–95.
36. Karnovsky M.J., Roots L. // *J. Histochem. Cytochem.* 1964. V. 12. P. 219–221.
37. Xie W., Altamirano C.V., Bartels C.F., Speirs R.J., Cashman J.R., Lockridge O. // *Mol. Pharmacol.* 1999. V. 55. P. 83–91.
38. Bartels C.F., Jensen F.S., Lockridge O., van der Spek A.F., Rubinstein H.M., Lubrano T., La Du B.N. // *Am. J. Hum. Genet.* 1992. V. 50. P. 1086–1103.
39. Wang Y., Boeck A.T., Duysen E.G., van Keuren M., Saunders T.L., Lockridge O. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004. V. 196. P. 356–366.
40. Preininger A., Schlokot U., Mohr G., Himmelspach M., Stichler V., Kyd-Rebenburg A., Plaimauer B., Turecek P.L., Schwarz H.P., Wernhart W., Fischer B.E., Dorner F. // *Cytotechnology.* 1999. V. 30. P. 1–15.
41. Wajih N., Hutson S.M., Owen J., Wallin R. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 31603–31607.
42. Jossé L., Smales C.M., Tuite M.F. // *Biotechnol. Bioeng.* 2010. V. 105. P. 556–566.
43. Meleady P., Henry M., Gammell P., Doolan P., Sinacore M., Melville M., Francullo L., Leonard M., Charlebois T., Clynes M. // *Proteomics.* 2008. V. 8. P. 2611–2624.
44. Roncarati R., Seredenina T., Jow B., Jow F., Papini S., Kramer A., Bothmann H., Dunlop J., Terstappen G.S. // *Assay Drug Dev. Technol.* 2008. V. 6. P. 181–193.
45. Chilukuri N., Sun W., Naik R.S., Parikh K., Tang L., Doctor B.P., Saxena A. // *Chem. Biol. Interact.* 2008. V. 175. P. 255–260.
46. Jain S., Hreczuk-Hirst D.H., McCormack B., Mital M., Epentetos A., Laing P., Gregoriadis G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. V. 1622. P. 42–49.