

УДК 577.2

Высокопродуктивная линия-продуцент фактора свертывания крови IX человека на основе клеток СНО

С. В. Ковнир¹, Н. А. Орлова¹, М. И. Шахпаронов², К. Г. Скрыбин¹, А. Г. Габибов²,
И. И. Воробьев^{1,2*}

¹Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия
Октября, 7, корп. 1

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: ptichman@gmail.com

Поступила в редакцию 03.03.2017

Принята к печати 05.02.2018

РЕФЕРАТ Больные гемофилией В – наследственным нарушением свертывания крови – нуждаются в регулярном применении препаратов фактора свертывания крови IX. Рекombинантный фактор IX человека, продуцируемый в культивируемых клетках линии СНО, практически эквивалентен природному фактору IX плазмы крови и широко используется в современной клинической практике. Получение биосимильного рекомбинантного фактора IX человека предполагает создание клональной клеточной линии с максимально возможной удельной продуктивностью и высоким уровнем удельной прокоагуляционной активности секретируемого фактора IX. Ранее на основе нетранслируемых участков гена фактора элонгации трансляции Гальфа китайского хомячка нами было разработано семейство плазмидных векторов p1.1 и p1.2, позволяющее проводить амплификацию целевого гена в геноме клеток-продуцентов под действием метотрексата, а также котрансфекцию вспомогательных генов, сцепленных с различными селекционными маркерами. Природная область открытой рамки считывания гена фактора IX человека в векторе p1.1 была трансфицирована в клетки линии СНО DG44. В результате трех последовательных шагов амплификации и последующего клонирования получена линия клеток, продуцирующая фактор IX с удельной продуктивностью 10.7 ± 0.4 пг/клетка/день. Прокоагуляционная активность секретируемого фактора IX была практически полностью восстановлена путем котрансфекции клеток плазмидами семейства p1.2, несущими гены растворимого варианта протеазы PACE/furin и витамин K-оксидоредуктазы китайского хомячка. Клональная линия-продуцент 3B12-86 позволяла накапливать фактор IX в бессывороточной культуральной среде до концентрации 6 МЕ/мл при простом периодическом культивировании, при этом копияность интегрированного гена фактора IX составила всего 20 копий/геном, а интегрированных генов PACE/furin и VKORC1 – три и две копии/геном соответственно. Фактор IX человека, секретируемый линией 3B12-86, был очищен при помощи трех стадий хроматографии до удельной активности 230 МЕ/мг с выходом более 30%. Полученная клональная линия-продуцент фактора IX и метод очистки продукта позволяют вести экономически обоснованное промышленное производство биосимильного рекомбинантного фактора IX для терапии гемофилии В.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА гемофилия В, системы гетерологичной экспрессии рекомбинантных белков, фактор свертывания крови IX.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ СНО – Chinese hamster ovary – клетки яичника китайского хомячка *Cricetulus griseus*; DHFR – дигидрофолатредуктаза [КФ 1.5.1.3]; EMCV – вирус энцефаломиокардита; FIX – фактор свертывания крови IX; среда NAT – среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин; IRES – внутренний сайт связывания рибосом; MTX – метотрексат; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор; VKORC1 – субъединица 1 комплекса 2,3-эпоксидредуктазы витамина K [КФ 1.17.4.4]; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время; БСА – бычий сывороточный альбумин; МЕ – международная единица активности фактора IX (соответствует содержанию фактора IX в 1 мл пулированной донорской плазмы); ОРС – открытая рамка считывания; ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени.

ВВЕДЕНИЕ

Фактор IX (FIX) – это профермент сериновой протеазы каскада свертывания крови, которая в присутствии Ca^{2+} и мембранных фосфолипидов гидролизует связь аргинин–изолейцин в молекуле фактора X с образованием активированного фактора X (FXa). Нековалентный комплекс факторов IXa, VIIa и X, связанных с фосфолипидной мембраной – «теназа» – является основным элементом петли положительной обратной связи каскада свертывания крови.

Ген *FIX* расположен на X-хромосоме. Врожденное отсутствие или низкий уровень функционально активного фактора IX приводят к развитию гемофилии В, X-связанному рецессивному генетическому заболеванию, встречающемуся приблизительно у одного из 30 тысяч мужчин. В частности, гемофилия королевских семей Европы – Royal family disease, обусловлена точечной мутацией гена *FIX*, приводящей к нарушению сплайсинга его мРНК и появлению неактивного укороченного белка *FIX* [1].

Первоначально терапия гемофилии В ограничивалась периодическими переливаниями плазмы крови, впоследствии замененными на концентраты протромбинового комплекса – смеси витамин K-зависимых факторов свертывания крови IX, II, VII и X. Основным ограничением такой терапии был риск развития тромбоза. При фракционировании плазмы крови методом Кона получены лекарственные препараты *FIX* с большей степенью чистоты, содержавшие, однако, примеси активированного *FIX* (*FIXa*) и других факторов свертывания, таким образом, риск тромботических эпизодов сохранялся. Дополнительная иммуноаффинная очистка *FIX* позволила полностью удалять эти примеси, но, как и в случае других продуктов переработки плазмы крови, не устраняла угрозу вирусного или прионного заражения. Препараты природного *FIX*, полученные путем очистки на иммобилизованных моноклональных антителах мыши, также могут вызывать аллергические реакции на иммуноглобулин мыши и потенциально способствовать появлению нейтрализующих *FIX* антител, т.е. ингибиторной формы гемофилии В [2].

Клонирование кДНК *FIX* [3] и первые успешные попытки получения рекомбинантного *FIX* в гетерологичных системах [4, 5] были проведены в 1980–1985 гг. В 1986 г. на основе линии CHO получили продуцент *FIX* с достаточно высокой удельной продуктивностью [6]. Лекарственный препарат рекомбинантного *FIX* – нонаког альфа (торговое название Бенефикс) – одобрен к применению в США и странах ЕС в 1997 г. В процессе получения лекарственного препарата исключено использование веществ животного происхождения и компонентов донорской

плазмы. Нонаког альфа получают в клетках CHO, культивируемых в питательной среде, не содержащей сыворотки или других продуктов животного происхождения. Выделение и очистку *FIX* проводят в четыре хроматографические стадии, не используя иммуноаффинную хроматографию, потенциально присутствующие вирусы удаляют при помощи нанофильтрации на фильтре с порогом отсечения 70 кДа. В готовой лекарственной форме нонакога альфа не используется альбумин человека [7].

Циркулирующий зрелый *FIX* имеет молекулярную массу около 57 кДа и среднюю концентрацию в плазме крови около 90 нМ. *FIX* состоит из четырех структурных доменов – Gla-домена, двух ЭФР-подобных доменов (ЭФР – эпидермальный фактор роста) и C-концевого домена сериновой протеазы. N-Концевой лидерный пептид *FIX* отделяется при транслокации полипептида в эндоплазматический ретикулум; пропептид, непосредственно предшествующий Gla-домену, отделяется при секреции зрелого белка. Активационный пептид, расположенный между вторым ЭФР-подобным доменом и доменом сериновой протеазы, отделяется при активации *FIX*. Активация *FIX* в каскаде свертывания крови осуществляется активированным фактором XI (внутренний путь) или активированным фактором VII (внешний путь).

Содержащий 12 γ -карбоксилированных остатков Glu Gla-домен расположен на N-конце молекулы зрелого *FIX*. Он обеспечивает связывание *FIX* и *FIXa* с поверхностью эндотелиальных клеток [8]. Первый ЭФР-подобный домен *FIX* содержит высокоаффинный сайт связывания иона кальция, а также обуславливает взаимодействие *FIX* с фактором VIIa и с тканевым фактором (фактором III). Второй ЭФР-подобный домен *FIX* принимает участие в образовании комплекса *FIXa*–FVIIa–FX. Он соединяется с доменом сериновой протеазы при помощи активационного пептида и единственной дисульфидной связи.

Активационный пептид *FIX* содержит большую часть сайтов посттрансляционных модификаций, влияющих на свойства *FIX*, в том числе N-связанные олигосахариды [9]. Вследствие этого единственным существенным отличием рекомбинантного *FIXa*, полученного в клетках CHO, от природного *FIXa*, является уровень β -гидроксилирования остатка Asp64, составляющий в природном *FIX* 0.24 моль/моль, а в рекомбинантном – 0.4 моль/моль [8]. Блокирование этой посттрансляционной модификации при помощи ингибиторов 2-кетоглутарат-диоксигеназы не приводило к существенному изменению прокоагуляционной активности *FIX*. C-Концевой домен сериновой протеазы составляет около полови-

ны общей массы FIX, содержащийся в нем активный сайт скрыт активационным пептидом и экспонируется после его отделения.

Из всех посттрансляционных модификаций только γ -карбоксилирование в домене Gla непосредственно определяет прокоагуляционную активность FIX. Тем не менее рекомбинантный FIX, полученный в клетках CHO, имеет одно существенное отличие от природного FIX в качестве лекарственного средства – уровень восстановления прокоагуляционной активности FIX *in vivo* у пациентов при инфузии препаратов рекомбинантного FIX в среднем в 1.29 раза ниже, чем в случае природного концентрата FIX человека [10]. Причины, вызывающие меньшее восстановление прокоагуляционной активности у рекомбинантного FIX, остаются неясными, поскольку сравнительные клинические исследования фармакокинетики препаратов FIX показывают несколько больший период полувыведения рекомбинантного FIX: 36 ч у рекомбинантного FIX против 32.7 ч у природного FIX [11]. Возможной причиной пониженного восстановления активности рекомбинантного FIX *in vivo* может быть отсутствие сульфатирования Tyr158 и/или фосфорилирования Ser155 в составе активационного пептида, однако доказательства в пользу этой гипотезы получены только на животных моделях гемофилии В [12].

Во многих случаях продуктивность систем гетерологичной экспрессии гена FIX человека определялась не уровнем биосинтеза собственно FIX, а способностью клетки-хозяина осуществлять его корректную посттрансляционную модификацию. В частности, значительная доля секретируемого FIX, продуцируемого в клетках CHO, неактивна при практически любом уровне удельной продуктивности, так как содержит непроцессированный пропептид, полностью блокирующий функционирование Gla-домена. Восстановление нормального процессинга пропептида FIX возможно при коэкспрессии субтилизин/кексин-подобной конвертазы PACE/furin или гомологичной ей конвертазы PC5. Наилучший уровень удаления пропептида у секретируемого FIX может быть достигнут при коэкспрессии 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 [7].

Активность FIX также определяется уровнем γ -карбоксилирования остатков Glu в Gla-домене. В полностью активном FIX первые 10 остатков Glu из 12 должны быть конвертированы в остатки Gla. В молекуле природного FIX все 12 остатков Glu в Gla-домене полностью γ -карбоксилированы, а в препаратах рекомбинантного FIX уровень мо-

дификации двух последних остатков снижен, что не влияет на свойства FIX. Следует отметить, что стандартный метод очистки рекомбинантного FIX при помощи анионообменной хроматографии с элюцией раствором CaCl_2 при низкой ионной силе позволяет эффективно удалять молекулы FIX с нефункциональным Gla-доменом, поэтому недостаточный уровень γ -карбоксилирования FIX влияет скорее на выход готового продукта, чем на удельную прокоагуляционную активность очищенного FIX. Общее число остатков Gla в очищенном рекомбинантном FIX 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 витамин K-зависимая γ -глутаминкарбоксилаза (GGCX [КФ 4.1.1.90]) [13], реакция происходит в просвете эндоплазматического ретикулума и предшествует транслокации пробелков в аппарат Гольджи. Источником присоединяемой карбоксильной группы служит растворенный углекислый газ, а донором электронов и кофактором GGСХ – восстановленная дигидрохиноновая форма витамина К (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 катализируется ферментным комплексом VKOR, или VKORC (vitamin K oxidoreductase complex), основным компонентом которого является интегральный белок – субъединица 1 комплекса 2,3-эпоксид-редуктазы витамина К (VKORC1 [КФ 1.1.4.1]) [14].

При попытках сверхэкспрессии 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 сверхэкспрессия GGСХ не приводит к повышению удельной активности FVII. Одновременно с этим сверхэкспрессия гена FVII в клетках линий HepG2 (клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека) и ВНК (клетки почки сирийского хомяка) позволяет получать преимущественно функционально активный белок. Причиной различий в способности клеток разных линий обеспечивать протекание реакции γ -карбоксилирования является различный уровень активности комплекса VKOR. Сверхэкспрессия гена VKORC1 человека в клетках линии CHO позволяет получить функционально ак-

тивный продукт и существенно повысить скорость секреции фактора VII [15].

Сходные данные получены для FIX, секретируемого клетками линии ВНК [16]. В системах экспрессии фактора IX в клетках CHO, лимитированных уровнем процессинга пропептида целевого белка, уровень γ -карбоксилирования, обеспечиваемый эндогенным ферментом VKORC1, был достаточен для получения фактора IX с полной функциональной активностью [7]. Тем не менее при существенном увеличении уровня экспрессии гена *FIX* степень γ -карбоксилирования остатков Glu в Gla-домене может существенно снизиться, на что указывают сильные различия в уровне секреции FIX клетками линии HepG2 (трансформированные гепатоциты) и линиями клеток, полученных из других тканей [17]. Клетки HepG2 обладают высокой активностью VKORC1 и соответственно секретируют FIX более эффективно.

Обычным способом увеличения витамин K-оксидоредуктазной активности в культивируемых клетках считается их трансфекция плазмидой, кодирующей известный ген *VKORC1* человека. Однако относительная каталитическая эффективность этого метода в клетках других видов млекопитающих не очевидна. Ортологи *VKORC1* разных видов млекопитающих не полностью гомологичны друг другу, и их каталитическая эффективность *in vitro* различается примерно в 4 раза [18]. В настоящий момент белковый состав комплекса VKOR не установлен. Наиболее вероятным источником электронов для работы VKORC1 считают тиоредоксин-подобные белки эндоплазматического люмена, в том числе TMX [19]. Мембранная топология VKORC1 установлена только по аналогии с бактериальным белком из *Synechococcus* sp. Пространственная цепь переноса электронов к цистеинам активного центра VKORC1 пока не описана, в отличие от его гомолога VKORC1L1 [20].

Мы предположили, что низкая активность комплекса VKOR в клетках линии CHO может быть вызвана не низкой каталитической эффективностью собственного VKORC1 китайского хомячка, а лишь недостаточным уровнем его экспрессии. Таким образом, требуемый максимальный уровень секреции FIX человека в клетках CHO может быть обеспечен путем коэкспрессии целевого гена, растворимого варианта PACE/furin человека и VKORC1 китайского хомячка. При этом необходимый уровень экспрессии вспомогательных генов может быть определен путем отбора клональных линий клеток-продуцентов по доле коагуляционно активных молекул FIX с удаленным пропептидом. Получение и характеристика таких линий-продуцентов FIX являются целью настоящей работы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Создание генетических конструкций для экспрессии генов

Создание экспрессионных векторов p1.1, p1.2-Zeo и p1.2-Hug описано в работе [21]. Фрагменты ДНК, кодирующие целевые открытые рамки считывания (ОРС) генов *FIX* человека, *VKORC1* человека или китайского хомячка, или фурин человека, слитые с консенсусной последовательностью Козак (GCCGCCATGG) [22], 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 T4 (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 Research, США). Молекулярное клонирование проводили в штамме *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, США). Плазмидную ДНК выделяли при помощи набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Литва).

В качестве источника ОРС FIX использовали коммерчески доступный клон кДНК FIX человека pCMV6-XL4/NM_000133.2 (sc126517, Origene, США) и адапторные праймеры AD-9-AbsF и AD-9-NheR, приведенные в табл. 1. Область ОРС VKORC1 человека амплифицировали с плазмиды pCMV6-XL4/NM_024006.4 (sc112318, Origene) с праймерами AD-hVKO-AbsIF и AD-hVKO-NheIR.

С целью получения ОРС VKORC1 китайского хомячка из 2 млн клеток CHO DG44 реагентом TRI Reagent (MRC) выделяли суммарную РНК. кДНК синтезировали при помощи набора MINT («Евроген»), используя 2 мкг 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 получением плазмиды pAL-CHOVKORC1. Нуклеотидная последовательность вставки была депонирована 03.04.2012 в GenBank под номером JQ400047.1. Аминокислотная последовательность ОРС фермента VKORC1 клеток CHO DG44 депонирована в GenBank (03-APR-2012) под 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.

Таблица 1. Праймеры для клонирования и секвенирования экспрессионных плазмид

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'
FIX	
AD-9-AbsF	ttcctcgaggccgccaccatgcagcgcgtgaac atg
AD-9-NheR	atgctagctttcattaagtgagctttg
9SQf	cggtatgtcaactggattaag
9-AS	ctgctggttcacaggactt
VKORC1	
vkof1	gtcgacatgggcaccacctgag
vkof2	gacatgggca ccacctggag gagccc
vkor1	ctcagggccttttggccttgtgttc
AD-CVKO-AbsIF	ttcctcgaggccgccaccatgggcaccacctgg
AD-CVKO-NheIR	atgctagctcagggcctttt ggcct
AD-hVKO-AbsIF	ttcctcgaggccgccaccatgggcagcacctgg ggga
AD-hVKO-NheIR	atgctagctcagtgctcttagccttg
Фурин	
AD-FUR-AbsF	ttcctcgaggccgccaccatggagctgaggcctg
AD-FUR-NheR	aatctagactatcaactcaggcaggtgtgagggc
IP-fVQ-F	gctgcagaggagcctcaagtacagtggtgga acagcaggtg
IP-fVQ-R	cacctgctgttccagcactgtacttgaggctccc tctgcagc
SQ-FUR639-F	caacggtgtctgtgtgtagg
SQ-FUR1228-F	gcccaacctcaatgccaacg
SQ-FUR1563-R	cagggtggagcgggtg
SQ-fVQ-R	gttccagcactgtacttg
Праймеры к векторам	
T7prom	taatacgactcaactataggg
SP6	gatttaggtgacactatag
3CH1-Rev	acaaacagttctgagaccg
SQ-5CH6-F	gccgctgcttctctgtgac
IRESArev	aggtttccgggccctcacattg

ОПС PACE/furin человека получали путем 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 согласно [23] со следующими модификациями: праймеры фосфорилировали полинуклеотидкиназой фага T4 («Сибэнзим») в буфере для ДНК-лигазы фага T4 (Fermentas) в течение 30 мин 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 для эндонуклеазы DpnI, добавляли 10 ед. акт. этой эндонуклеазы и инкубировали при 37°C в течение 30 мин, затем инкубировали при 72°C с 2.5 ед. акт. полимеразы Pfu еще 30 мин, 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, правильные ОПС встраивали в экспрессионные векторы p1.1, p1.2-Zeo или p1.2-Hygro по AbsI-NheI-сайтам. ДНК для трансфекции выделяли с помощью препаративного набора EndoFree Plasmid MaxiKit (Qiagen, США) или ДНК GeneJet™ Midi (Fermentas). Перед трансфекцией секвенировали основные функциональные элементы векторов и повторно области целевых ОПС. Плазмиды линейаризовали эндонуклеазами PvuI (p1.1 и p1.2-Zeo) или BspHI (p1.2-Hygro), осаждали этанолом, растворяли в фосфатно-солевом буфере (PBS) и стерилизовали фильтрацией через 0.22-мкм фильтры (Millipore, США).

Культивирование клеток CHO DG44 (Invitrogen) и трансфекцию плазмидой p1.1-F9 проводили как описано в [21]. Через 48 ч после трансфекции клетки помещали в селекционную среду CD CHO (Invitrogen) с 200 нМ метотрексата (MTX) и 8 мМ глутамина и культивировали до восстановления жизнеспособности клеток выше 85% (около 20 дней), пассивуя 1 раз в 3–4 дня. Полученную популяцию клеток клонировали методом предельных разведений (1 клетка на лунку) в среде EX-CELL® CHO Cloning Medium (Sigma-Aldrich) с добавлением 8 мМ глутамина и без MTX. Продуктивные клоны определяли методом ИФА, отобранные клоны последовательно переносили в 24-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, с помощью ИФА отбирали 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 мМ МТХ до восстановления жизнеспособности клеток выше 85% в течение 15–20 дней. Полученную в присутствии 4 мМ МТХ культуру клеток с наибольшей удельной продуктивностью использовали во втором клонировании методом предельных разведений. Отобрали клон 3В12, который реадаптировали для суспензионного культивирования в среде ProCHO 5 и использовали для последовательной котрансфекции линейаризованных плазмид p1.2-Hyg-Fur и p1.2-Zeo-VKORC. Селекцию стабильно трансфицированных популяций проводили при помощи антибиотиков гиромидина Б и зеоцина соответственно. Поликлональную популяцию 3В12-FurVC использовали для окончательного клонирования методом предельных разведений как описано выше. Полученные клоны были последовательно разделены на группы по уровню экспрессии растворимого PACE/furin и уровню прокаогуляционно активного FIX. Отобранные клоны повторно адаптировали к среде ProCHO 5 с 8 мМ глутамина и 1 мМ витамина К3 (менадионсульфат, Sigma-Aldrich) и суспензионному культивированию в колбах Эрленмейера.

ПЦР в реальном времени

ПЦР-РВ проводили 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 повторях. Геномную ДНК выделяли при помощи набора Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega). Суммарную РНК выделяли при помощи набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США). Для получения необходимых количеств кДНК использовали по 1 мкг суммарной РНК и набор реактивов Mint («Евроген»).

Праймеры для ПЦР-РВ подбирали при помощи программы Beacon Designer v7.51, проверяли на специфичность при помощи NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Использовали праймеры, негомологичные последовательностям китайского хомячка (к области FIX и IRES-DHFR). Данные ПЦР-РВ обрабатывали, используя программу iCycler Iq4, включая расчет эффективности реакций. Число копий вставки экспрессионной кассеты в геноме рассчитывали по калибровочной кривой, построенной для серийных разведений плазмиды p1.1-F9. Результаты ПЦР сравнивали с результатами для контрольного ампликона из состава гена PPIB, представленного в ге-

Таблица 2. Специфические праймеры для ПЦР в реальном времени

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'
RT-F9-F	ttagatgtaacatgtaacattaagaatggcag
RT-F9-R	cattaaatgattgggtgctttgag
RT-ID-F	gccacaagatctgccaccatg
RT-ID-R	gtaggtctccgttcttccaatc
RT-HYG-F	ttcgctccaacaatgctc
RT-HYG-R	gtctgctgctccatacaag
RT-Zeo-F	agttgaccagtccgttcc
RT-Zeo-R	ggcgaagctgctctccac
RT-FURC-F	agcgggacctgaatgtaag
RT-FURC-R	ggtggttctctcgatgcca
RT-PPIB-F	gcaggcaagacaccaatg
RT-PPIB-R	ctccacctctcactacatc
RT-bACT-F	gctctttccagccttctt
RT-bACT-R	gagccagagcagtgatctcc
RT-cVKOspN-F	aacgggtttgccgcagaac
RT-cVKOspN-R	cgtaatcctcgtctcgg
RT-cVKOspC-F	gggcttgatgttgcttaatttc
RT-cVKOspC-R	gcaggtgttagggtaaatg

номе клеток CHO только 1 раз, по поисковой выдаче алгоритма BLAST из базы данных NCBI Nucleotide Collection.

Уровень экспрессии мРНК рассчитывали с использованием относительного метода $\Delta\Delta C_q$ для праймеров с известной эффективностью ПЦР. Относительное увеличение уровня (разы) экспрессии гена, нормированного по контрольному гену, определяли по формуле из [24].

Праймеры для оценки копияности экспрессионной кассеты в геноме и уровня мРНК приведены в табл. 2.

Саузерн-блот гибридизация

Биотиновую метку вводили в ДНК 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 [21], либо продукт амплификации плазмиды p1.1-F9 с праймеров AD-9-AbsF и AD-9-NheR, соответствующий OPC FIX. Геномную ДНК для блотин-

га расщепляли эндонуклеазой AраI в течение 16 ч и разделяли в 0.8% агарозном геле. Подготовку геля и перенос на мембрану Amersham Hybond-N+ (GE Healthcare, США) проводили по протоколу производителя мембраны в буфере с высокой ионной силой 20 × SSC (3 M NaCl, 0.3 M цитрат натрия) в течение 16 ч. ДНК фиксировали нагреванием мембраны до 80°C в течение 2 ч. Прегибридизацию и гибридизацию проводили по [25] в растворе 7% додецилсульфата натрия, 0.5 M фосфата натрия, pH 7.2, 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) в течение 16 ч при 65°C. Мембрану промывали по протоколу производителя, детекцию проводили при помощи набора Biotin Chromogenic Detection Kit (Fermentas).

Измерение концентрации FIX методом ИФА

Концентрацию FIX определяли по [26] с использованием в качестве иммобилизованного антитела поликлональные антитела кролика к FIX (LifeSpan BioSciences, США) по 50 нг/лунку. В качестве специфичного антитела использовали моноклональные антитела мыши Н1Х-1 (F2645, Sigma-Aldrich). Образцы вносили в лунки без разведения или разводили в PBS с 1% БСА. Долю молекул FIX с неотделенным пропептидом определяли при помощи ИФА, используя в качестве иммобилизованных антител аффинно очищенные антитела кролика к синтетическому пептиду, соответствующему пропептиду FIX человека, согласно [27]. Остальные шаги ИФА проводили как указано выше.

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

Измерение активности фурина

Активность фурина определяли при помощи пептидного субстрата с отделяемой группой 7-амино-4-метилкумарина Pыр-Arg-Thr-Lys-Arg-АМС (344935, Merck Millipore, США) по [27].

Измерение активности VKORC1

Активность VKORC1 измеряли с использованием DTT в качестве донора электронов по методике [28]. Субстрат ферментативной реакции – 2,3-эпоксид витамина K1 (K > O) – синтезировали и очищали из хиноновой формы витамина K1 (Sigma Aldrich, США) [29].

Выделение и очистка FIX

FIX выделяли и очищали по следующей методике: культуральную среду наносили на колонку с сорбентом Capto MMC, уравновешенную раствором 20 mM цитрата натрия, pH 7.0, 100 mM NaCl, 0.02% Твин-80, промывали раствором 20 mM цитрата натрия, pH 7.0, 0.1 M NaCl. FIX элюировали раствором 20 mM цитрата натрия, pH 6.5, 200 mM NaCl, 0.5 M аргинина, 0.02% Твин-80. Элюат разбавляли в 4 раза водой и наносили на колонку с сорбентом Capto Q, уравновешенную раствором 50 mM Tris-HCl pH 8.0; 100 mM NaCl; промывали раствором 50 mM Tris-HCl pH 8.0; 200 mM NaCl и проводили ступенчатую элюцию растворами 50 mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM CaCl₂, 100–500 mM NaCl. Фракции элюата, содержащие FIX с полной прокоагуляционной активностью, разбавляли водой в 2 раза и наносили на колонку с сорбентом Capto Heparin, уравновешенную раствором 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 100 mM NaCl, промывали колонку раствором 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 200 mM NaCl. FIX элюировали раствором 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 500 mM NaCl. Раствор очищенного FIX концентрировали ультрафильтрацией при помощи кассеты VivaFlow200 10 кДа PES (Sartorius Stedim, Германия) и переводили в раствор хранения, содержащий 8 mM L-гистидина, 0.8% сахарозы, 208 mM глицина, pH 7.2 и 0.004% Твин-80. Раствор очищенного FIX разделяли на аликвоты, замораживали и хранили при температуре ниже –70°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение линии клеток СНО, экспрессирующих ген фактора IX человека

Область открытой рамки считывания FIX с добавленной синтетической консенсусной последовательностью Козак и блоком стоп-кодонов клонировали в ранее разработанный нами экспрессионный вектор p1.1 на основе некодирующих областей гена фактора элонгации трансляции 1α альфа китайского хомячка с образованием экспрессионной плазмиды p1.1-F9 (рис. 1).

Протяженные геномные области и ген фактора элонгации трансляции 1α альфа китайского хомячка обеспечивали высокий уровень экспрессии целевых генов и постоянство этого уровня в течение нескольких месяцев последовательных пересевов [21]. Область ОРС гена FIX в плазмиде p1.1-F9 была соединена с селекционным маркером – дигидрофолатредуктазой мыши (DHFR) при помощи аттенюированного внутреннего сайта связывания рибосом вируса энцефаломиокардита (EMCV IRES), что обеспечивало экспрессию единой бицистронной мРНК. Такая структура обеспечивает максимально возможное сцепление целевого гена и селекционного маркера.

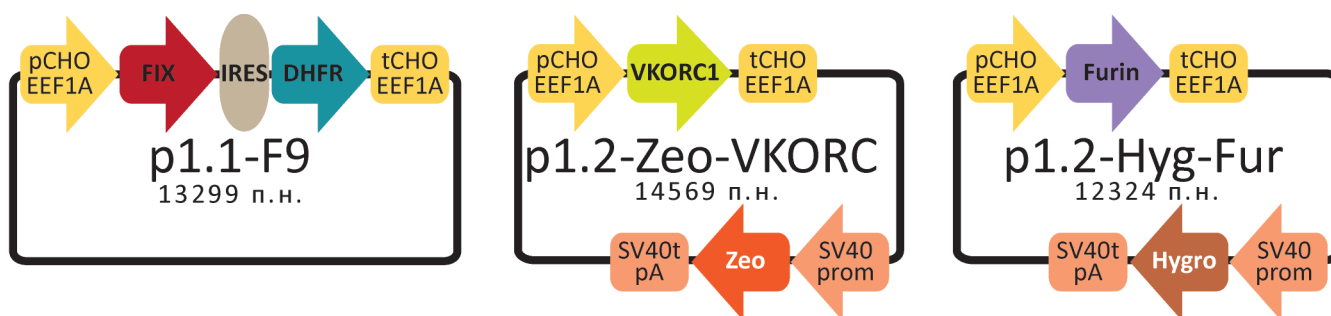


Рис. 1. Схемы экспрессионных плазмид p1.1-F9, p1.2-Zeo-VKORC, p1.2-Hyg-Fur. pCHO EEF1A – функциональный промотор гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, 5'-нетранслируемая область этого гена и нетранскрибируемая область, фланкирующая этот ген; IRES – внутренний сайт связывания рибосом вируса энцефаломиокардита (EMCV); DHFR – открытая рамка считывания 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 – ОПС фактора IX свертывания крови человека; VKORC – ОПС VKORC1 китайского хомячка; SV40 prom – область промотора вируса SV40; SV40t pA – терминатор и сигнал полиаденилирования вируса SV40; Zeo – ОПС гена *Sh ble* (*Streptoalloteichus hindustanus bleomycin*), обеспечивающего устойчивость к зеоцину; Furin – ОПС протеазы PACE/furin человека; Hygro – ОПС гигромицин-фосфотрансферазы. Стрелками указаны направления действия промоторов и транскрипции генов

ра, что необходимо для амплификации генетических кассет, интегрированных в геном клеток-продуцентов.

Плазмиду p1.1-F9 линеаризовали с разрушением гена бета-лактамазы и использовали для трансфекции клеток линии CHO DG44, дефектных по обоим аллелям гена *dhfr*. Через 48 ч после трансфекции клетки подвергали первичной селекции в присутствии трех различных концентраций метотрексата – 50, 100, 200 нМ. Во всех трех случаях получены стабильно трансфицированные популяции клеток с уровнями секреции FIX 0.69 ± 0.04 , 1.05 ± 0.05 и 1.83 ± 0.24 мкг/мл по данным ИФА соответственно при времени удвоения культур 27–29 ч. Максимальный титр FIX зафиксирован в культуре, полученной в присутствии 200 нМ МТХ, поэтому был проведен иммуноблотинг внутриклеточного и секретируемого этой культурой FIX (рис. 2А). Иммунореактивные полосы FIX с некорректной молекулярной массой не были обнаружены, что косвенно свидетельствовало об отсутствии повреждений генетических кассет, интегрированных в геном клеток. Полученную поликлональную культуру использовали для клонирования клеток методом предельных разведений. Клональные линии-продуценты FIX с максимальным титром продукта повторно адаптировали к условиям культивирования в суспензии среде без добавок нуклеотидов и ингибиторов DHFR. Уровень секреции FIX тремя лучшими клональными линиями составил 11.9 ± 0.4 ,

12.3 ± 0.4 , 9.9 ± 0.3 мкг/мл после 3 дней культивирования. Для дальнейшей работы выбрали клональную линию p1.1-F9-T2/S с удельной продуктивностью (Qp) 2.99 ± 0.06 пг/клетка/день и временем удвоения 22.5 ч.

Продуктивность клональной линии увеличивали путем амплификации целевого гена под действием возрастающих концентраций метотрексата. После повышения концентрации МТХ до 4 мкМ получили олигоклональную линию клеток с Qp 5.97 ± 0.18 пг/клетка/день, которую использовали для второго клонирования методом предельных разведений. Среди 12 наиболее продуктивных клонов клеток, повторно адаптированных к суспензионному культивированию, отобрали клон p1.1-F9-T2/4k-3B12 (далее в тексте и на рисунках – 3B12) с Qp 10.7 ± 0.4 пг/клетка/день и временем удвоения культуры 20.2 ч (рис. 2Б).

Получение линии клеток, секретирующих биологически активный FIX

FIX, секретируемый клональной клеточной линией 3B12, был практически полностью неактивным. Прокоагуляционная активность FIX в культуральной среде составляла 0.22 МЕ/мл при общей концентрации 59 мкг/мл (определение методом ИФА), что соответствовало удельной активности, составляющей 1.8% от активности природного фактора IX человека. Отсутствие биологической активности FIX могло быть вызвано двумя известными причинами – недо-

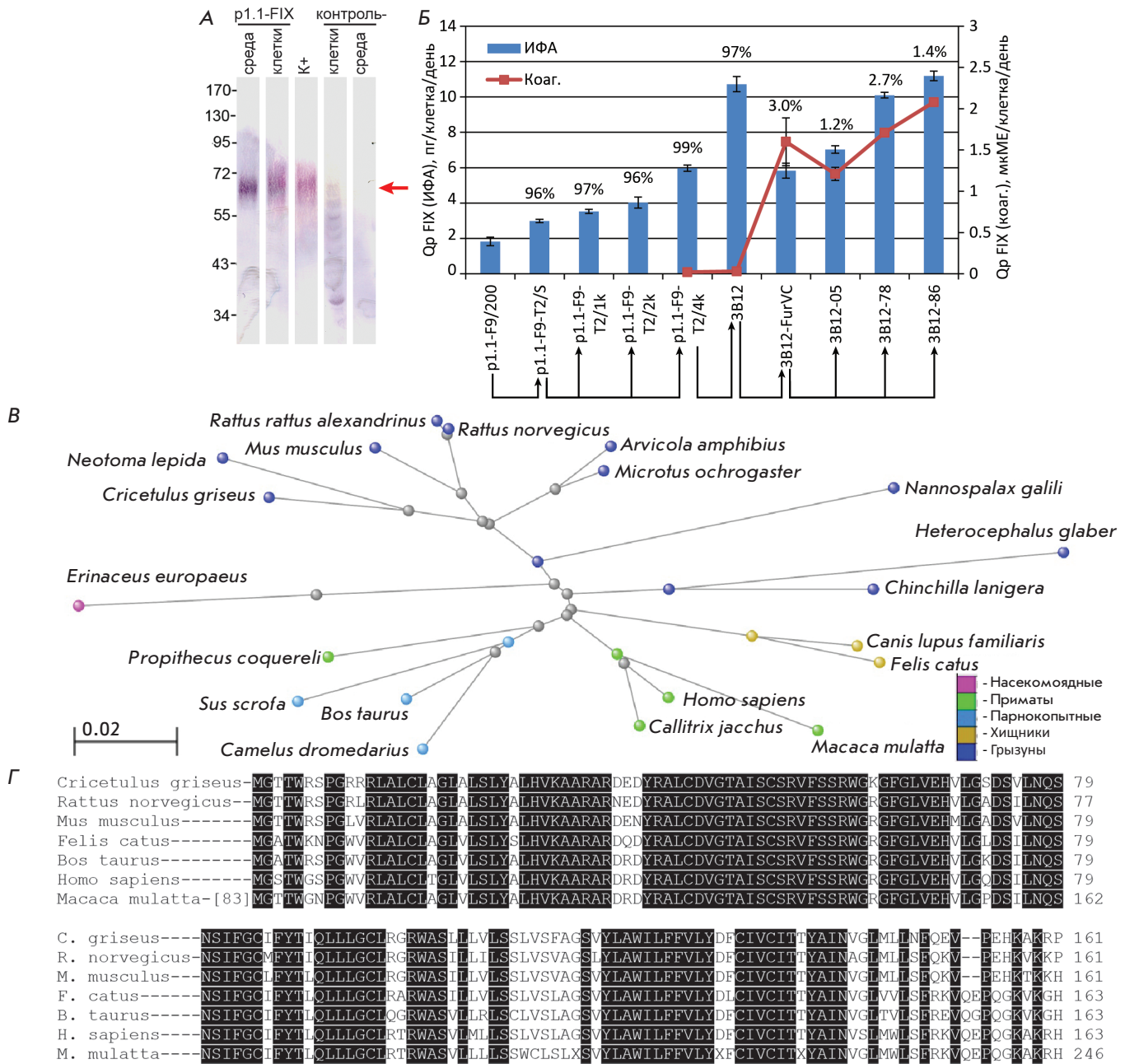


Рис. 2. Целостность секретируемого и внутриклеточного FIX линии клеток p1.1-F9-T2/S, уровни секреции FIX и изменение прокоагуляционной активности в линиях-продуцентах, филогения VKORC1 китайского хомячка. **А** – иммуноблоттинг секретируемого и внутриклеточного FIX. Электрофорез в ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях, детекция поликлональными антителами к фактору IX, молекулярная масса полос маркера указана в кДа. Обозначения: K+ – стандарт рекомбинантного FIX, контроль- – нетрансфицированные клетки CHO DG44. Положение полноразмерного FIX обозначено стрелкой. **Б** – уровень секреции FIX и степень отделения пропептида в популяциях клеток и клональных линиях. Удельная продуктивность линий клеток, измеренная методом ИФА, обозначена столбиками, левая шкала. Удельная продуктивность в терминах прокоагуляционной активности приведена как ломаная линия, правая шкала. Доля молекул FIX с отделенным пропептидом (%), определенная по ИФА, 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. **В** – таксономическое дерево VKORC1 млекопитающих, визуализировано при помощи программы Tree-Viewer (NCBI, США). Масштабный отрезок показывает эволюционное расстояние, соответствующее числу замен на одну аминокислоту. **Г** – множественное выравнивание последовательностей вариантов VKORC1 нескольких видов млекопитающих. Консервативные аминокислотные остатки обозначены черным фоном

Таблица 3. Уровень активности VKORC1 в стабильно трансфицированных клетках

Плазмида	Удельная активность VKORC1, % конверсии субстрата на 1 мг/мл общего белка в лизате за 1 ч	Относительный уровень увеличения активности VKORC1, разы
Интактные клетки CHO DG44	0.38	-
p1.2-Zeo-VKORC1	9.21	24.2
p1.2-Zeo-hVKORC1	3.03	8.0

Примечание: удельную активность рассчитывали для диапазонов линейной зависимости уровня конверсии субстрата от концентрации общего белка в лизатах.

статочным γ -карбоксилированием его Gla-домена [7] и сохранением пропептида у секретированных молекул FIX, что связано с невозможностью осуществления сколько-нибудь эффективного процессинга пропептида FIX эндогенными протеазами семейства PACE/furin клеток-хозяев [7].

Правильный процессинг пропептида фактора IX человека может быть обеспечен коэкспрессией гена сигнальной протеазы PACE/furin человека. Для коэкспрессии растворимого укороченного варианта PACE/furin человека мы использовали 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 гигромицину Б (рис. 1).

Для сверхэкспрессии эндогенного VKORC1 мы клонировали область открытой рамки считывания гена *vkorc1* из кДНК клеток CHO DG44 при помощи праймеров, гомологичных началу и концу ОРС гена *vkorc1* мыши. Секвенирование клонированного продукта ПЦР выявило приблизительно одинаковый уровень гомологии между *vkorc1* китайского хомячка и *vkorc1* мыши и человека (рис. 2В). VKORC1 китайского хомячка, в отличие от его ортологов у других млекопитающих, содержит мотив RRR [30] на границе первого трансмембранного домена и обладает значительно меньшей гомологией с *vkorc1* человека (рис. 2Г).

Охарактеризованная область ОРС гена *vkorc1* китайского хомячка депонирована в GenBank (AFG26681.1), а также клонирована в вектор p1.2-Zeo с образованием плазмиды p1.2-Zeo-VKORC1 (рис. 1). На основе того же вектора экспрессии создана также контрольная конструкция p1.2-Zeo-hVKORC1, содержащая область ОРС *vkorc1* человека.

На основе клеток CHO DG44 получены стабильно трансфицированные поликлональные популяции, экспрессирующие оба ортолога гена *vkorc1*. В лизате клеток была измерена витамин

K-оксидоредуктазная активность, а также определено число копий интегрированных экспрессионных кассет. Сверхэкспрессия обоих ортологов *vkorc1* привела к сильному увеличению оксидоредуктазной активности в лизате клеток (табл. 3), при этом VKORC1 китайского хомячка обеспечивал втрое большую удельную ферментативную активность, чем VKORC1 человека при практически одинаковом числе копий интегрированных кассет – 5.8 ± 0.3 и 5.5 ± 0.5 копии/геном для генов *vkorc1* китайского хомячка и человека соответственно. Уровень транскрипции обоих ортологов также не имел существенных отличий – у мРНК VKORC1 китайского хомячка составил $0.12 \pm 0.03\%$ от уровня мРНК β -актина; у мРНК VKORC1 человека – 0.09 ± 0.01 ; $P = 0.16$. Одновременно с этим обнаружено, что максимальная скорость конверсии субстрата $VK > O$ микросомальной фракцией белков, полученных из клеток, трансфицированных геном VKORC1 человека, составляет около 5% в 1 ч, а в случае VKORC1 китайского хомячка – не менее 9% в 1 ч (данные не приведены). Поскольку сверхэкспрессия аутологичного гена *vkorc1* в клетках CHO позволяет добиться максимальной витамин K-оксидоредуктазной активности, то этот вариант *vkorc1* использовали для котрансфекции линии клеток-продуцентов FIX.

Клетки клональной линии 3B12 последовательно трансфицировали линейризованными плазмидами p1.2-Zeo-VKORC и p1.2-Hygro-Fur. В полученной популяции стабильно трансфицированных клеток, содержащих три генетические кассеты – для экспрессии фактора IX и двух вспомогательных ферментов, удельная прокоагуляционная активность FIX в культуральной среде составила 27% от стандарта, при этом по данным ИФА доля молекул секретированного FIX с неотделенным пропептидом составляла только 3.1% (рис. 2Б). Таким образом, активность растворимого PACE/furin человека в полученной популяции клеток была достаточной для практически полного отделения пропептида, однако уровень

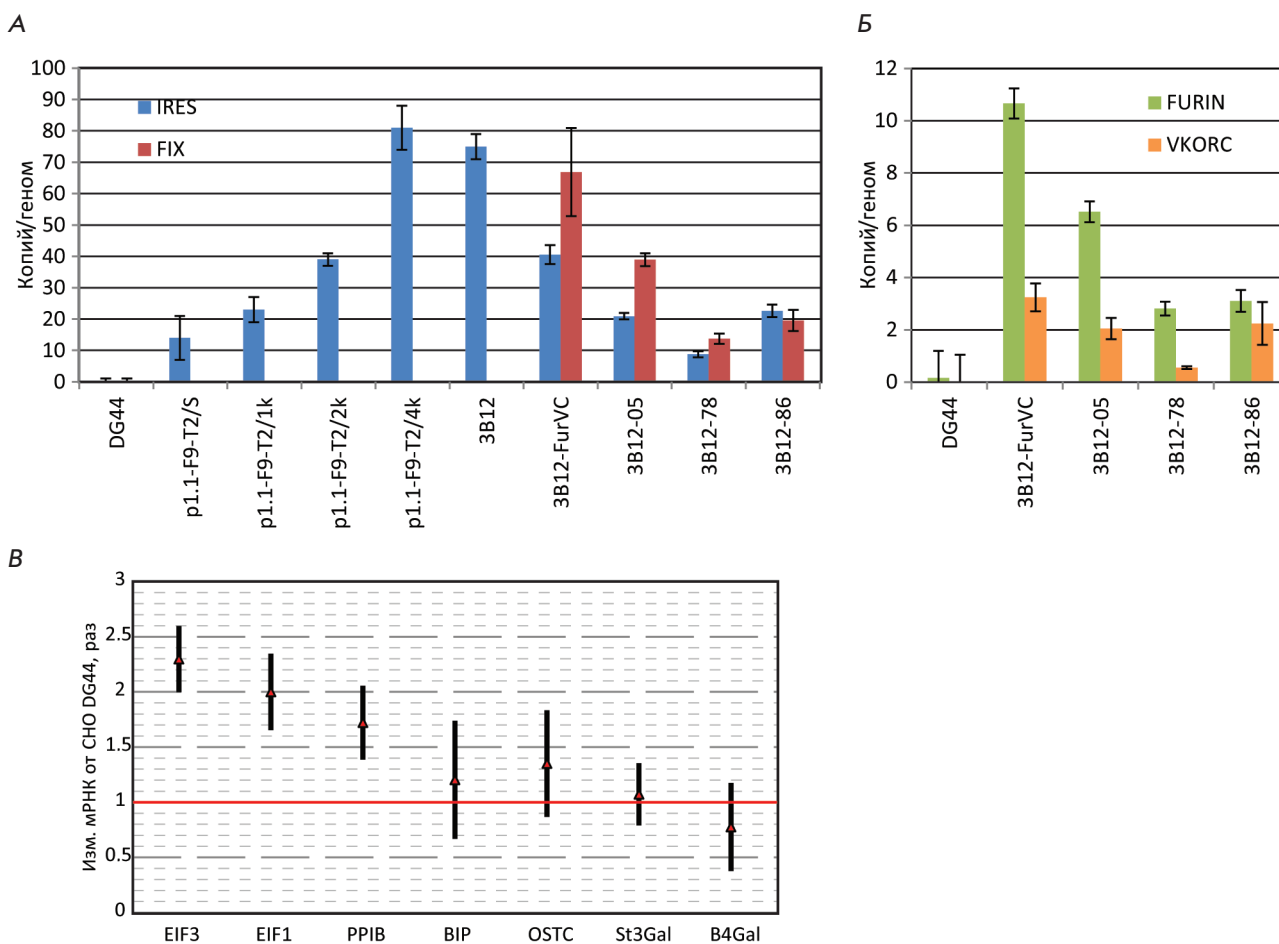


Рис. 3. Копийность целевого гена и вспомогательных генов ферментов фурина и VKORC1 в геноме линий-продуцентов, изменение уровня экспрессии генов домашнего хозяйства в линии клеток 3B12-86 методом количественной ПЦР. А – копийность гена *FIX* и области селекционного маркера (*IRES*). Обозначения: *IRES* – ампликон из области *IRES* и гена *DHFR*; *FIX* – ампликон из области ОРС фактора IX. Б – копийность вспомогательных генов фурина и VKORC1. Обозначения – FURIN – ампликон из области ОРС furin, VKORC – ампликон из области ОРС VKORC1. В – изменения в уровне экспрессии генов CHO, связанных с процессами трансляции и посттрансляционных модификаций синтезируемых белков в сравнении с нетрансфицированными клетками CHO DG44. Нормирование результатов по уровню мРНК бета-актина. Обозначения: EIF1 – эукариотический фактор инициации трансляции 1а, EIF3 – эукариотический фактор инициации трансляции 3, PPIB – пептидилпролилизомеразы В, BIP – иммуноглобулинсвязывающий белок (Grp78); OSTC – олигосахаридтрансфераза; St3Gal – бета-галактозид-альфа-2,3-сиалилтрансфераза 3; B4Gal – бета-1,4-галактозилтрансфераза 1. На всех панелях планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям, $n = 3-4$, приведены данные одного репрезентативного измерения из трех

γ -карбоксилирования в большей части клеток был недостаточным для правильного формирования Gla-домена FIX. Можно предположить, что не во всех стабильно трансфицированных клетках экспрессия вспомогательных ферментов была одинаково эффективной, но, в отличие от VKORC1, растворимый PACE/furin, выделяемый в культуральную среду частью клеток, обеспечивал отделение пропептида у всех секретированных молекул FIX.

Для выделения клеток, в которых максимально эффективно работают оба вспомогательных фер-

мента, т.е. образуется биологически активный FIX, провели клонирование полученной популяции методом предельных разведений, используя в качестве критериев отбора перспективных клонов прокоагуляционную активность секретируемого FIX и уровень пептидазной активности PACE/furin в культуральной среде. Из 199 первичных клонов клеток отобрали 80 с максимальной концентрацией FIX, из которых отобрали 24 клон с максимальной активностью PACE/furin, а из них 12 клонов с максимальной прокоагуляционной активностью FIX

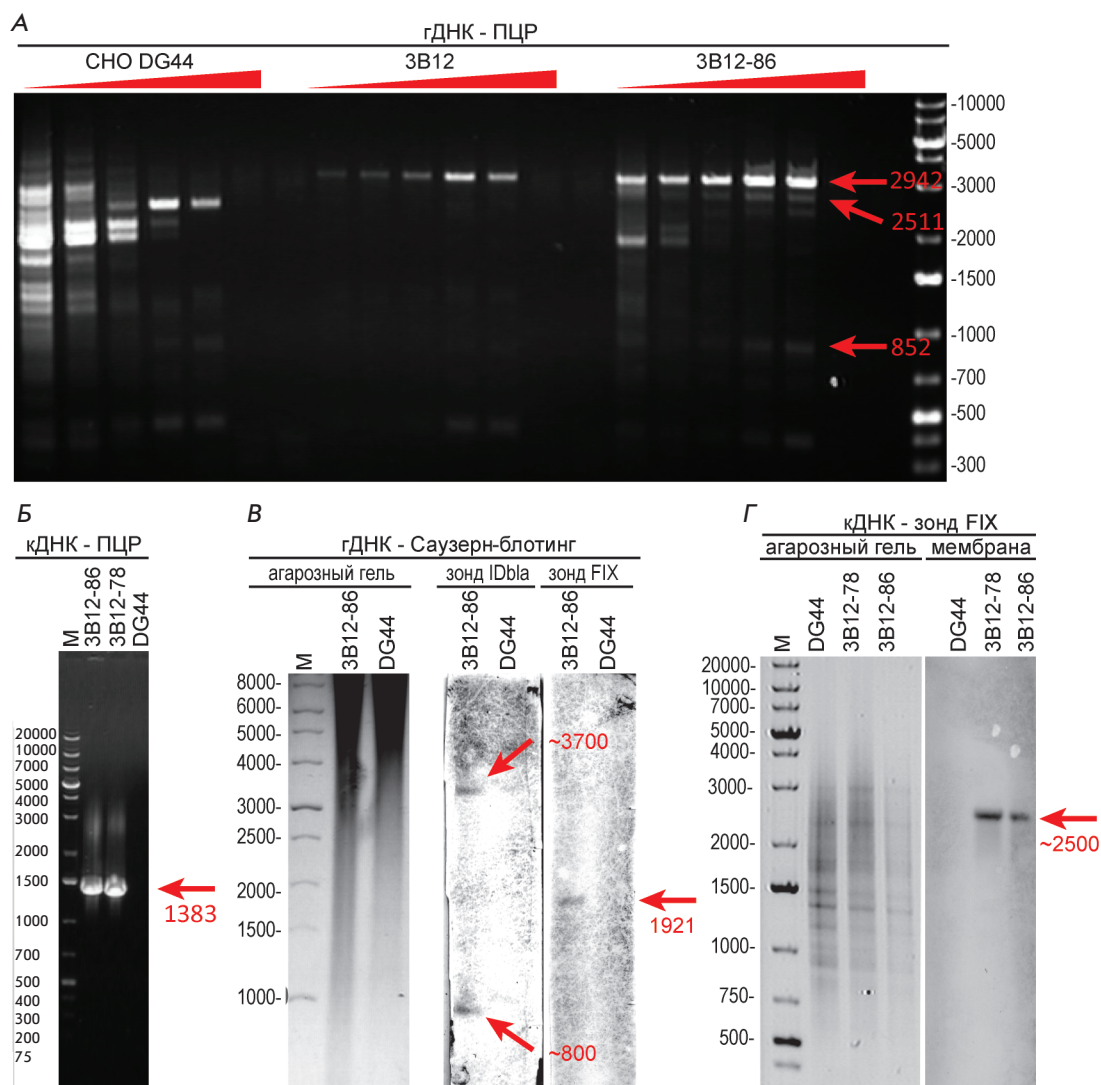


Рис. 4. Анализ области целевого гена в геномной ДНК и кДНК линий-продуцентов FIX методами ПЦР, ПЦР-РВ, Саузерн-блотинга и псевдонозерн-блотинга. Размеры полос маркера приведены в п.н. А – амплификация полных областей целевых генов в составе геномной ДНК (гДНК) методом ПЦР. Температурный градиент обозначен красными треугольниками, линейное изменение температуры отжига праймеров от 53 до 68. Красными стрелками обозначены продукты амплификации генов *FIX*, *фурина* и *VKORC1* соответственно. Б – ПЦР-РВ мРНК, праймеры к 5'- и 3'-концам ОРС *FIX*, красной стрелкой обозначен продукт амплификации ожидаемого размера. В – анализ геномной ДНК методом гибридизации по Саузерну с мечеными биотином зондами. Зонд IDbla – зонд, направленный к областям IRES, DHFR, гена устойчивости к ампициллину *bla* и области инициации репликации плазмид *ori*, зонд FIX – зонд к области ОРС *FIX*. Красными стрелками указаны размеры обнаруженных рестриционных фрагментов. Изображение электрофореграммы инвертировано, контраст изображений мембран увеличен для улучшения видимости. Г – анализ кДНК методом псевдонозерн-гибридизации. Обозначения как на панели В, стрелкой указан фактический размер кДНК *FIX*

(данные не приведены). Пять из 12 отобранных таким образом клональных линий успешно адаптировали к суспензионному культивированию в присутствии водорастворимого витамина К3, удельная прокоагуляционная активность *FIX* у всех клонов составляла более 185 МЕ/мг. Среди этих пяти кло-

нов была определена основная линия 3B12-86 с Q_p 11.2 ± 0.3 пг/клетка/день и две запасные линии – 3B12-78 и 3B12-05.

Копийность гена *FIX*, области его селекционного маркера и вспомогательных генов в геноме линий-продуцентов и родительских популяций кле-

Таблица 4. Таблица очистки FIX

Название фракции	FIX:Ag, МЕ/мл	Объем фракции, лмл	FIX:C, МЕ/мл	FIX:Ag, МЕ	Общий белок по УФ, мг	FIX:C, МЕ	FIX:C/белок, МЕ/мг	FIX:Ag/белок, МЕ/мг	Выход стадии по FIX:Ag	Общий выход по FIX:Ag	Доля FIX с про-пептидом, %
Культуральная среда	6.04	115	3.6	695	-	414	-	-	-	-	2.6
Capto MMC фракция проскока и промывки	0.166	273	-	45	-	-	-	-	7%	-	-
Capto MMC элюат	64.79	9	-	583	4.28	-	-	136	84%	84%	-
Capto Q фракция проскока	0.07	37	-	3	0.69	-	-	4	0.4%	-	-
Capto Q промывка 200 мМ NaCl	0.05	12.5	-	1	0.48	-	-	-	-	-	-
Capto Q элюция 10 мМ CaCl ₂	31.75	9.2	25.2	292	1.51	232	154	194	50%	62%	2
Capto Q 150 мМ NaCl + 10 мМ CaCl ₂	12.95	10.5	-	136	0.88	-	-	154	23%		
Capto Q 200 мМ NaCl + 10 мМ CaCl ₂	4.67	10.7	<1	50	0.83	<10.7	<12	60	9%	-	5.8
Capto Q 500 мМ NaCl + 10 мМ CaCl ₂	13.87	4	-	55	0.57	-	-	98	10%	-	-
Capto Нераpin фракция проскока	0.72	18	-	13	-	-	-	-	3%	-	-
Capto Нераpin элюат	36.10	9	38.6	325	1.46	347	237	222	76%	32%	<2

ток определяли методом количественного ПЦР (рис. 3А,Б). Копийность областей ORC FIX и DHFR не отличалась статистически значимо у всех исследованных объектов, т.е. ни в одном случае не обнаружены признаки «расщепления» целевого гена и гена селекционного маркера, т.е. изменения копииности гена селекционного маркера отдельно от целевого гена, несмотря на амплификацию генетических каскадов в геноме продуцентов. В ходе получения линии 3В12-86 наблюдались изменения копииности гена FIX человека: копииность гена FIX возрастала приблизительно в 5 раз при амплификации, сохранялась при клонировании амплифицированной популяции и затем упала в 4 раза при котрансфекциях плазмид со вспомогательными генами и повторного клонирования. Удельная продуктивность соответствующих линий клеток при этом не уменьшалась. Вероятно, при снятии селекционного давления наблюдалась потеря малоактивных копий генетической кассеты, возникших в процессе геномной амплификации.

Копийность вспомогательных генов во всех полученных клональных линиях была значительно ниже,

чем копииность гена FIX, поскольку отбор клонов клеток по критерию максимальной активности гена *vkorc1* не проводили, а в случае PACE/furin проведен только один раунд отбора, в котором отобрали треть от всех полученных клонов.

В основной линии-продуценте 3В12-86 методом ПЦР-РВ оценили изменение уровня экспрессии нескольких генов домашнего хозяйства, связанных с биосинтезом и посттрансляционным процессингом белков (рис. 3В). Ни у одного из проверенных генов не обнаружили значимого изменения уровня экспрессии, что указывает на отсутствие существенного изменения системы биосинтеза и процессинга белка клеток-хозяев, секретирующих FIX с достигнутой продуктивностью.

Оценка целостности области открытой рамки считывания целевого гена

Методом ПЦР с геномной ДНК и праймеров к областям промотора и терминатора использованных экспрессионных векторов показали, что преобладающие продукты ПЦР имеют «правильную» молекулярную

массу (рис. 4А), а именно, везде выявляется продукт размером 2942 п.н., соответствующий р1.1-F9, а в случае геномной ДНК линии ЗВ12-86 обнаружены также ампликоны длиной 2511 и 852 п.н., соответствующие областям ОРС VKORC1 и PACE/furin. Аналогичная амплификация кДНК из линии ЗВ12-86 с праймерами, гомологичными областям начала и конца ОРС FIX, также выявила только продукт нужного размера (рис. 4Б), что подтверждает отсутствие протяженных делеций или инсерций в области ОРС FIX или мутаций, приводящих к изменению сплайсинга мРНК FIX.

Блотинг по Саузерну на геномной ДНК из линии ЗВ12-86 с зондом, направленным к области ОРС FIX, выявил один рестрикционный фрагмент длиной 1921 п.н. (рис. 4В), что указывает на отсутствие в геноме продуцента генетических кассет, встроившихся с разрывом ДНК в области ОРС FIX. Блотинг по Саузерну с использованием зонда к участкам ДНК плазмиды, соответствующим области начала репликации плазмиды и области гена *bla*, выявил два рестрикционных фрагмента – тяжелый фрагмент около 3700 п.н., приблизительно соответствующий расчетной интеграции кассеты по сайту ее линейаризации рестриктазой PvuI, а также короткий фрагмент размером около 800 п.н., предположительно соответствующий интеграции кассеты с делецией ДНК вблизи сайта PvuI. Псевдонозерн-блотинг на кДНК, полученных из линий ЗВ12-86 и ЗВ12-78, также выявил только мРНК FIX ожидаемой длины (рис. 4Г).

Отсутствие мутаций в области ОРС FIX подтверждено также с помощью ПЦР-амплификации всей области ОРС FIX из геномной ДНК линии ЗВ12-86, клонирования ампликона и секвенирования вставки в трех плазмидных клонах. Во всех случаях не выявлено изменений в последовательности ОРС FIX (данные не приведены).

Выделение и очистка FIX

Выделение и очистку FIX из кондиционированной среды линии ЗВ12-86 проводили при помощи трех последовательных стадий – мультимодальной хроматографии с сорбентом Capto MMC, позволяющим извлекать FIX из кондиционированной среды без ее дополнительной подготовки; псевдоаффинной хроматографии на анионообменном сорбенте Capto Q с элюцией прокоагуляционно активных молекул FIX хлоридом кальция при низкой ионной силе; аффинной хроматографии на специализированном сорбенте Capto Heparin, отделяющем гепаринсвязывающие белки от остальных молекул. Суммарный выход продукта составил 32%, удельная прокоагуляционная активность FIX в процессе очистки превысила 230 МЕ/мг, что соответствует показателям известного лекарственного препарата рекомбинантного FIX

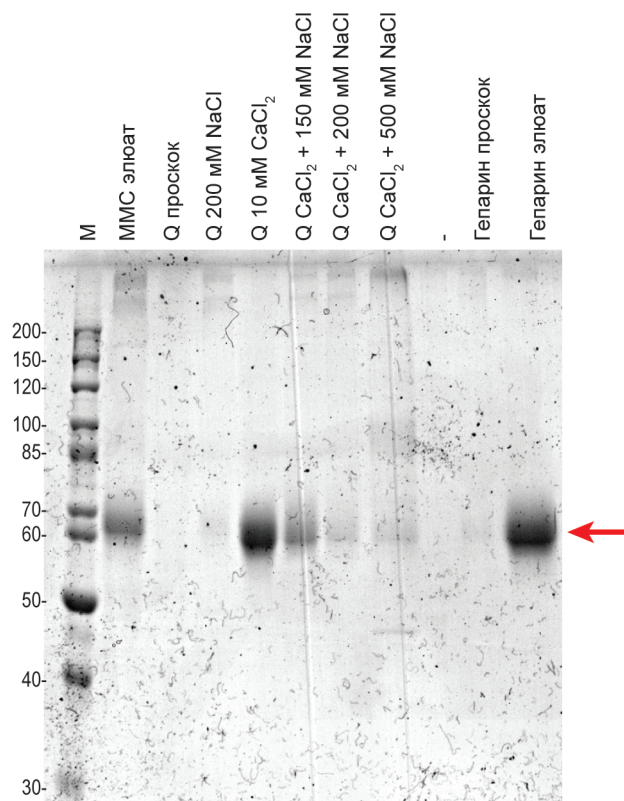


Рис. 5. Анализ белковых фракций при хроматографической очистке FIX методом ДСН-ПААГ. Электрофорез в невозстанавливающих условиях, молекулярные массы в кДа, окраска коллоидным Кумасси синим. Обозначения: М – маркер, «элюат» – фракция элюата соответствующей колонки, «проскок» – фракции не связавшихся с сорбентом белков. Для фракций элюатов с колонки Capto Q указаны соответствующие концентрации NaCl, концентрация CaCl₂ всюду одинакова и составляет 10 мМ

(табл. 4). По данным гель-электрофореза (рис. 5) большая часть молекул FIX элюировалась с сорбента Capto Q при добавлении ионов Ca²⁺ к низкосолевою элюенту, что указывает на наличие у этой части молекул FIX правильно сформированного Gla-домена, структурная перестройка которого при хелатировании ионов Ca²⁺ вызывает элюцию Gla-белков с анионообменного носителя.

ВЫВОДЫ

Разработанный нами ранее набор векторов на основе нетранслируемых участков гена *EEF1A1* китайского хомячка может использоваться для получения линий клеток, секретирующих большие количества функционально активного FIX человека. Целевой ген может быть амплифицирован в геноме продуцентов путем культивирования клеток в присутствии воз-

растающих концентраций МТХ, что приводит к многократному повышению секреции FIX. Достаточный уровень экспрессии вспомогательных генов *vkorc1* и *PACE/furin* может быть обеспечен котрансфекцией «совместимых» плазмид с генами устойчивости к антибиотикам. Полученные клональные линии-продуценты FIX содержат относительно небольшое число копий целевого гена и только несколько копий вспомогательных генов в составе хромосомной ДНК, что может способствовать поддержанию постоянства уровня секреции при длительном культивировании.

Сравнительный анализ сверхэкспрессированных ортологов гена фермента VKORC1 показал, что аутологичный VKORC1 китайского хомячка обеспечивает вдвое большую ферментативную активность при одинаковом числе копий искусственного гена *vkorc1* в геноме. Такой способ сверхэкспрессии гена *vkorc1* может применяться для получения в клетках СНО не только продуцентов FIX, но и других витамин К-зависимых белков. Особенно перспективным представляется использование гена *vkorc1* китайского хомячка для получения фактора VII свертывания крови человека в клетках СНО. Применяемая в настоящее время для промышленного производства FVII линия клеток ВНК сочетает сравнительно высокую актив-

ность комплекса VKOR с низким общим уровнем секреции FVII, а также с определенными ограничениями режима культивирования – в отличие от СНО эта линия требует присутствия в среде фетальной сыворотки крупного рогатого скота и способна к нормальному росту только в адгезионных условиях.

Высокая удельная продуктивность созданной линии-продуцента фактора свертывания крови FIX позволит использовать для промышленного получения FIX простое периодическое культивирование продолжительностью 4–5 дней, титр FIX при этом составляет около 6 МЕ/мл. Такой метод получения FIX не нуждается в специализированных биореакторах с системами перфузии или в разработке способов поддержания жизнеспособности клеточной культуры в течение длительного времени, что значительно упрощает и удешевляет процесс промышленного производства рекомбинантного фактора IX человека. ●

*Авторы выражают благодарность
А.Л. Берковскому за ценные рекомендации
и реагенты для коагулометрии.
Работа проводилась при поддержке Минпрома
(№ 121/13-ФМП-05.07ОК) и РФФИ (№ 16-34-01026
и 16-34-60242).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rogaev E.I., Grigorenko A.P., Faskhutdinova G., Kittler E.L., Moliaka Y.K. // *Science*. 2009. V. 326. № 5954. P. 817.
- Puetz J., Soucie J.M., Kempton C.L., Monahan P.E. // *Haemophilia*. 2014. V. 20. № 1. P. 25–31.
- Kurachi K., Davie E.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1982. V. 79. № 21. P. 6461–6464.
- Anson D.S., Austen D.E., Brownlee G.G. // *Nature*. 1985. V. 315. № 6021. P. 683–685.
- De la Salle H., Altenburger W., Elkaim R., Dott K., Dieterle A., Drillien R., Cazenave J.P., Tolstoshev P., Lecocq J.P. // *Nature*. 1985. V. 316. № 6025. P. 268–270.
- Kaufman R.J., Wasley L.C., Furie B.C., Furie B., Shoemaker C.B. // *J. Biol. Chem*. 1986. V. 261. № 21. P. 9622–9628.
- McGrath B.M., Walsh G. *Directory of Therapeutic Enzymes*. Boca Raton: CRC Press, 2005.
- Derian C.K., VanDusen W., Przysiecki C.T., Walsh P.N., Berkner K.L., Kaufman R.J., Friedman P.A. // *J. Biol. Chem*. 1989. V. 264. № 12. P. 6615–6618.
- Makino Y., Omichi K., Kuraya N., Ogawa H., Nishimura H., Iwanaga S., Hase S. // *J. Biochem*. 2000. V. 128. № 2. P. 175–180.
- Poon M.C., Lillicrap D., Hensman C., Card R., Scully M.F. // *Thromb. Haemost.* 2002. V. 87. № 3. P. 431–435.
- Lissitchkov T., Matysiak M., Zavislska K., Laguna P., Gercheva L., Antonov A., Moret A., Caunedo P., Aznar J.A., Woodward M.K., Paez A. // *Haemophilia*. 2013. V. 19. № 5. P. 674–678.
- Bond M., Jankowski M., Patel H., Karnik S., Strang A., Xu B., Rouse J., Koza S., Letwin B., Steckert J., Amphleand G., Scoble H. // *Semin. Hematol*. 1998. V. 35. № 2 Suppl 2. P. 11–17.
- Berkner K.L. // *Annu. Rev. Nutr*. 2005. V. 25. P. 127–149.
- Garcia A.A., Reitsma P.H. // *Vitam. Horm.* 2008. V. 78. P. 23–33.
- Bolt G., Steenstrup T.D., Kristensen C. // *Thromb. Haemost.* 2007. V. 98. № 5. P. 988–997.
- Wajih N., Hutson S.M., Owen J., Wallin R. // *J. Biol. Chem*. 2005. V. 280. № 36. P. 31603–31607.
- De Castilho Fernandes A., Fontes A., Gonsales N., Swiech K., Picanco-Castro V., Faca S., Covas D. // *Biotechnol. Appl. Biochem*. 2011. V. 58. № 4. P. 243–249.
- Wilson C.R., Sauer J.M., Carlson G.P., Wallin R., Ward M.P., Hooser S.B. // *Toxicology*. 2003. V. 189. № 3. P. 191–198.
- Schulman S., Wang B., Li W., Rapoport T.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 34. P. 15027–15032.
- Tie J.K., Jin D.Y., Stafford D.W. // *J. Biol. Chem*. 2014. V. 289. № 13. P. 9396–9407.
- Orlova N.A., Kovnir S.V., Hodak J.A., Vorobiev I.I., Gabibov A.G., Skryabin K.G. // *BMC Biotechnol*. 2014. V. 14. P. 56.
- Kozak M. // *Nucl. Acids Res*. 1987. V. 15. № 20. P. 8125–8148.
- Griffin A.M., Griffin H.G. *Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends*. Horizon Scientific Press, 1995.
- Dussault A.A., Pouliot M. // *Biol. Procd. Online*. 2006. V. 8. P. 1–10.
- Church G.M., Gilbert W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1984. V. 81. № 7. P. 1991–1995.
- Harlow E., Lane D. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- Bristol J.A., Furie B.C., Furie B. // *J. Biol. Chem*. 1993. V. 268. № 10. P. 7577–7584.
- 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. // *Nature*. 2004. V. 427. № 6974. P. 537–541.
- Tishler M., Fieser L.F., Wendler N.L. // *J. Am. Chem. Soc*. 1940. V. 62. № 10. P. 2866–2871.
- Alves D.S., Castello-Banyuls J., Faura C.C., Ballesta J.J. // *FEBS Lett*. 2011. V. 585. № 8. P. 1169–1174.