

УДК 577.2

# Использование трансгенных животных в биотехнологии: перспективы и проблемы

О. Г. Максименко<sup>1</sup>, А. В. Дейкин<sup>1</sup>, Ю. М. Ходарович<sup>2</sup>, П. Г. Георгиев<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*E-mail: georgiev\_p@mail.ru

Поступила в редакцию 28.06.2012

**РЕФЕРАТ** В течение последних 20 лет предпринимались многочисленные попытки использования животных для производства рекомбинантных белков человека и моноклональных антител. Однако только недавно на рынке появились два первых терапевтических препарата, полученных из молока трансгенных животных: С1-ингибитор (Ruconest) и антитромбин (ATryn). Это позволяет надеяться на доведение в ближайшем времени до практического применения большего числа новых рекомбинантных белков, созданных с помощью этой технологии. В настоящем обзоре описаны способы получения трансгенных животных, обсуждаются преимущества и недостатки их использования для производства рекомбинантных белков человека и моноклональных антител.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** биореактор, продукция белков в молоке, производство моноклональных антител, рекомбинантные белки, терапевтические препараты, трансгенные животные.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** мАТ – моноклональные антитела; МИ – микроинъекция ДНК в ядро; ПЯ – перенос ядер; РБ – рекомбинантный белок; рчАБ – рекомбинантный альбумин человека; рчБХЭ – рекомбинантная бутирилхолинэстераза человека; ТЖ – трансгенное животное; FDA – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов (США); ЕМЕА – Европейское агентство по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов; СНО – культура клеток яичников китайского хомячка; ES-клетки – эмбриональные стволовые клетки; НТО – нетранслируемая область гена.

## ВВЕДЕНИЕ

После успешной экспрессии первых рекомбинантных белков (РБ) в бактериях и дрожжах стало понятно, что в данных системах нельзя эффективно производить многие РБ человека. Так, в клетках бактерий белки человека не подвергаются посттрансляционным модификациям, а характер модификаций в клетках дрожжей отличается от модификаций в клетках человека. Кроме того, в данных экспрессионных системах не происходит правильный фолдинг многих сложных РБ человека [1, 2]. Поэтому встал вопрос о необходимости развития альтернативных систем экспрессии, способных обеспечить правильные посттрансляционные модификации РБ. В результате началась параллельная разработка двух технологических платформ – на основе трансгенных животных и в культурах клеток млекопитающих.

Первый успешный опыт получения трансгенных млекопитающих в результате микроинъекции генно-инженерной конструкции в пронуклеус зиготы мыши был осуществлен более 20 лет назад [3].

С тех пор в научных целях, для улучшения пород животных и продукции РБ получено большое количество трансгенных животных (ТЖ) [4–9]. В конце прошлого века сложилось представление, согласно которому ТЖ считали наиболее перспективной платформой для производства РБ человека и моноклональных антител (мАТ). Однако, несмотря на это, доминирующую роль в производстве РБ заняли культуры клеток млекопитающих и, в первую очередь, клетки яичников китайского хомячка (СНО). Так, к 2012 году на рынке США было представлено 312 терапевтических препаратов, полученных с помощью живых организмов [10]. С использованием культур клеток млекопитающих получено 193 продукта, из них 42 – в культуре клеток СНО. Во многом это обусловлено тем, что только в 2006 году Европейским агентством лекарственных средств (ЕМЕА) был одобрен антитромбин – первый рекомбинантный белок, выделенный из молока трансгенных коз [11]. Этот белок в дальнейшем разрешили для коммерциализации Управлением по контролю качества



Рис. 1. Схема получения трансгенных животных методом переноса ядер (верхняя часть) и микроинъекции ДНК в ядро (нижняя часть)

пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA) в качестве препарата для предотвращения образования тромбов у пациентов с наследственным дефицитом антитромбина. В 2011 году ЕМЕА одобрило применение рекомбинантного С1-ингибитора эстеразы, произведенного в кроликах, при наследственном ангионевротическом отеке. Появление первых допущенных к медицинскому применению терапевтических препаратов, полученных с использованием ТЖ, дает основания предполагать, что в ближайшее время РБ займут значительную нишу в биотехнологии. Некоторые биотехнологические компании (PPL Therapeutics (Англия), GTC Biotherapeutics (США) (поглощена в 2010 году компанией LFB Biotechnologies, Франция), Hematech (США), Genzyme (США), ZymoGenetics (США), Nexia Biotechnologies (Канада), Pharming (Нидерланды), BioProtein Technologies (Франция), Avigenics (США), Viragen (США) и TranXenoGen (США)) активно работают над развитием этой технологии. В настоящем обзоре приведены общие представления о получении ТЖ для продукции РБ человека и мАТ.

### ОСНОВНЫЕ СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

К методам, позволяющим получать сельскохозяйственных животных-продуцентов, содержащих трансген во всех клетках и передающих его потомкам, сегодня можно отнести микроинъекцию ДНК в пронуклеус зигот (МИ) и перенос ядер соматических клеток (ПЯ). Наибольшее распространение получил метод микроинъекции ДНК в мужской пронуклеус зигот [12] (рис. 1). Линейная ДНК при по-

падании в ядро способна встраиваться в геном клеточных линий или живых организмов [13]. Обычно ДНК встраивается в транскрипционно неактивные, бедные генами, районы и в гетерохроматин. В один геномный сайт может попасть от одной до нескольких десятков и даже сотен копий инъецированной конструкции. Впервые эту технологию опробовали на мышах, и до сих пор она остается надежным способом получения ТЖ. С использованием данного способа получили также первых сельскохозяйственных ТЖ. Однако в настоящее время методом МИ получают в основном трансгенных мышей, кроликов и свиней. Это связано с недостаточной эффективностью метода, обусловленной низкой частотой встраивания рекомбинантной ДНК в геном, доступностью зигот на стадии двух пронуклеусов; результат зависит от проведения большого числа хирургических операций, а значит, содержания значительного (200–300 голов) экспериментального стада и квалифицированной работы с животными. Кроме того, единственный способ определения уровня экспрессии встроившегося трансгена – исследование первичных ТЖ и их потомков. Репродуктивный цикл у крупных животных (с учетом времени достижения физиологической зрелости и необходимости получить от первичных трансгенных самок самок-продуцентов РБ с молоком) составляет примерно 0.9/2.3 года у самок/самцов коз, 1.0/2.3 года – у свиней, 2.3/4.5 года – у коров. Эти ограничения увеличивают себестоимость получения первичных ТЖ и время, требуемое для организации такой работы.

В 1997 году путем переноса ядра (ПЯ) соматической клетки молочной железы в ооцит был получен

клон овцы [14]. Это достижение открыло возможности удешевления и упрощения процедуры получения сельскохозяйственных ТЖ (рис. 1), поскольку большая часть работы в этом случае переносится с фермы в лабораторию, где проводят трансфекцию соматических клеток и отбирают клоны, в которых произошла интеграция трансгена в геном. Затем ядро соматической клетки инъецируется в энуклеированный ооцит, который трансплантируют самкам-реципиентам. Обычно для ПЯ используются клетки фибробластов. Большая часть крупных сельскохозяйственных животных в последнее время была получена методом ПЯ [12]. Однако в данном случае трансфицированные клетки отбирают с помощью маркерных генов устойчивости к антибиотикам, что усложняет сертификацию полученных рекомбинантных белков в FDA и EMEA [15]. Для увеличения эффективности такого отбора в качестве дополнительного селекционного агента часто используют флуоресцентные белки, например усиленный зеленый флуоресцентный белок (eGFP) [16]. Параллельно для удаления селекционных маркеров из генома отобранных клеточных линий применяют, в частности, системы на основе сайт-специфичных рекомбиназ [17].

К негативным последствиям ПЯ-метода относятся низкая выживаемость эмбрионов в ходе внутриутробного развития и слабое здоровье родившихся животных [12]. Это объясняется в том числе неполным репрограммированием соматического ядра, в результате чего нарушается экспрессия ряда генов, необходимых для правильного протекания эмбриогенеза. Кроме того, процесс получения полноценных яйцеклеток и их активация также требуют значительных временных и материальных затрат. В результате, один из мировых лидеров в использовании ПЯ для получения сельскохозяйственных ТЖ, компания «AgroResearch» (Новая Зеландия) отказалась от этого метода. В настоящее время компания разрабатывает альтернативные способы получения сельскохозяйственных ТЖ.

Альтернативой методам МИ и ПЯ могла бы стать технология сайт-специфического трансгенеза с использованием эмбриональных стволовых (ES) клеток [18]. В этом методе трансген встраивают в геном ES-клеток, отбирают клоны с правильной интеграцией нужного числа копий, затем трансгенные ES-клетки вводят в полость бластоцисты, которая трансплантируется самке-реципиенту. После трансплантации таких клеток в яичники взрослых мышей до 30% родившихся мышат могут содержать трансген. Все операции с животными могут проводиться нехирургическими методами, которые широко применяются в животноводстве; для получения трансгенов требуется относительно мало бластоцист, а значит, и не-

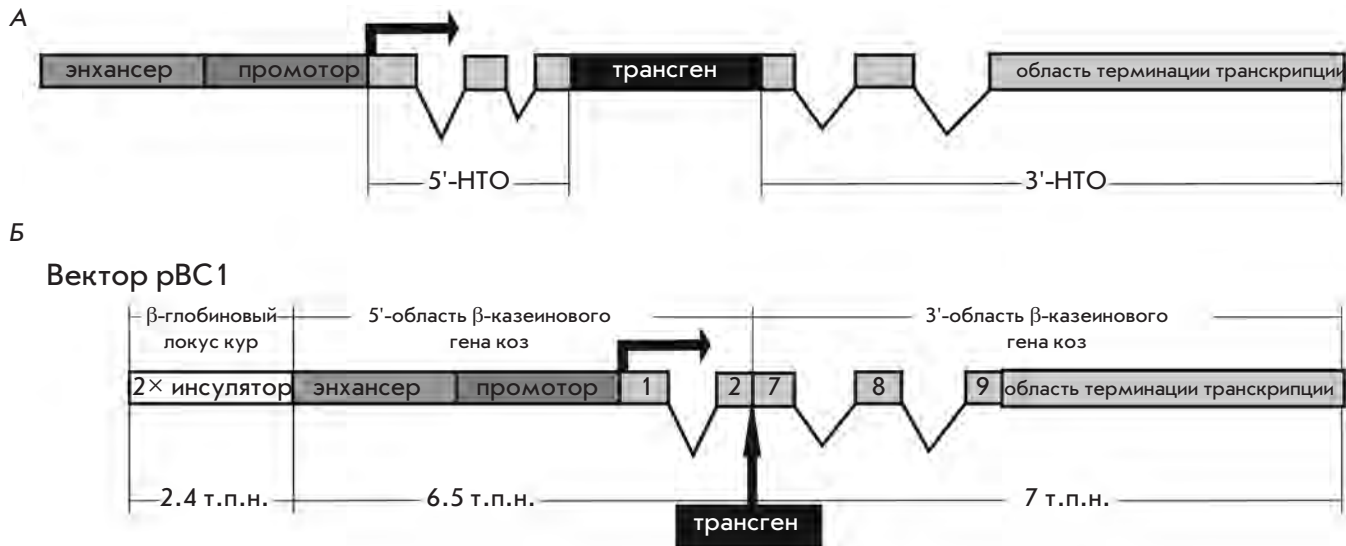
большое экспериментальное стадо. Однако этот метод отработан только на мышах и крысах, а линии ES-клеток для сельскохозяйственных животных пока не получены. Сходный подход заключается в трансформации стволовых клеток – предшественников сперматозоидов, и их последующей трансплантации в семенные каналцы нефертильных самцов [19].

Другие способы получения ТЖ применяются в настоящее время сравнительно редко. Так, ТЖ можно достаточно эффективно получать, используя ретровирусы, содержащие трансген [12]. Для этого зиготы, лишенные защитной оболочки, культивируют в среде с добавленными лентивирусными частицами, после чего трансплантируют приемным самкам. В зависимости от титра лентивируса происходит интеграция от одной до нескольких копий трансгена, при этом трансгенными могут быть почти 100% потомства [12]. К преимуществам данного метода относится эффективное получение ТЖ любых видов, а также и возможность получить ТЖ только с одной копией трансгена, что иногда бывает необходимо для научных целей. К основным недостаткам метода можно отнести невозможность использования интронов в составе генной конструкции и ограничение максимальной длины трансгена (примерно до 8000 п.н.), что определяется размером вирусной частицы. В результате с помощью этого метода очень трудно добиться высокого уровня экспрессии трансгена.

Перспективным способом получения ТЖ является использование векторов на основе мобильных генетических элементов, которые встраиваются в геном с помощью транспозазы [12]. В зиготу коинъецируют ген, кодирующий транспозазу, и трансген, фланкированный концевыми повторами транспозона. В результате реакции, катализируемой транспозазой, одиночная копия трансгена встраивается в одно или несколько мест в геноме животного. Этот подход уже использовался для получения крупных сельскохозяйственных животных, например свиней [20]. Эффективность интеграции трансгена в этом случае зависит от типа транспозона, длины трансгена, концентрации и места инъекции ДНК и достигает 50% [20]. Однако пока отсутствуют данные об уровнях экспрессии целевого гена в ТЖ, полученных таким способом.

Отдельно следует упомянуть группу методов, основанных на заражении органа или ткани организма дефектным по репликации аденовирусом, содержащим ген целевого белка, что приводит к непродолжительной и не передающейся по наследству продукции РБ в этом органе или ткани.

В настоящее время трудно сравнивать эффективность новых и традиционных методов получения ТЖ.



**Рис. 2.** Векторы для продукции рекомбинантных белков. А – Структура вектора для продукции рекомбинантных белков в трансгенных животных и клеточных линиях. Б – Строение вектора рBC1, используемого для продукции рекомбинантных белков в молоке трансгенных животных

**ЭКСПРЕССИОННЫЕ ВЕКТОРЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

В экспрессионных векторах, обеспечивающих продукцию РБ в молоке, используют регуляторные области генов, белковые продукты которых составляют мажорную фракцию молока. Наиболее популярны регуляторные области гена лактоглобулина овцы, гена кислых белков молочной сыворотки грызунов (мышь, крыса) и кролика, генов α-лактальбумина и α-S1-казеина коровы и гена β-казеина козы [5]. Обычно в экспрессионный вектор включают протяженную 5'-область (1–7 т.п.н.), которая состоит из промотора, тканеспецифичных энхансеров, усиливающих экспрессию в молочной железе, первых некодирующих экзонов и расположенных между ними интронов (рис. 2А). В первых интронах генов с высокой долей вероятности могут находиться регуляторные элементы, способные усиливать транскрипцию гена. В экспрессионный вектор также включают 3'-нетранслируемую область (НТО) гена, размеры которой могут варьировать от 0.5 до 10 т.п.н. и более. Обычно в состав 3'-НТО включают последние некодирующие экзоны и интроны, сайт полиаденилирования и прилежащие последовательности, которые потенциально могут усиливать терминацию транскрипции. В векторной конструкции 5'- и 3'-НТО могут принадлежать как одному, так и разным генам.

Среди промоторов, используемых для экспрессии в молочных железах, одним из наиболее эффективных для продукции целевых белков в молочных

железах мышей, коз и коров считается промотор гена β-казеина (табл. 1). На основе этого промотора создан самый популярный коммерческий вектор для продукции РБ в молоке ТЖ – рBC1 (Invitrogen) (рис. 2Б). С использованием этого вектора получено большинство трансгенных линий коз с высоким уровнем продукции целевого белка. В этом векторе используется регуляторная область гена β-казеина размером 6.2 т.п.н., состоящая из промотора и гормон-зависимого энхансера, который стимулирует промотор только в клетках молочной железы [31]. В состав вектора также входят 7.8 т.п.н. 3'-области гена β-казеина, которая обеспечивает эффективную терминацию транскрипции, что необходимо как для образования стабильной мРНК, кодирующей целевой белок, так и для предотвращения транскрипции прилежащих геномных районов, способной вызывать формирование репрессированного хроматина по механизму РНК-интерференции. Для накопления целевого белка в молоке кодирующая часть гена должна содержать последовательность сигнального пептида, необходимого для секреции. Такую последовательность можно взять из любого гена, кодирующего секретлируемый белок.

В зависимости от поставленных задач в вектор встраивают либо полный ген с интронами, либо его кДНК, либо мини-ген, содержащий только часть интронов. Как правило, использование гена с неизменной экзон-интронной структурой позволяет получить в ТЖ намного более высокие уровни про-



**Таблица 1.** Сравнение уровня продукции рекомбинантных белков (РБ) молока человека в трансгенных животных (ТЖ) с использованием различных вариантов генной конструкции

РБ/конструкция	Регуляторные элементы	ТЖ/способ получения	Максимальный уровень продукции РБ, мг/мл	Ссылка
<b>Лактоферрин</b>				
Нативный ген	Бакмида	Корова/ПЯ	3.4	[16]
Нативный ген	WAP-ген (21 т.п.н.) (мышь)	Мышь/МИ	30	[21]
–“–	$\beta$ -казеиновый промотор (коза) + инсулятор	Мышь/МИ	160	[22]
–“–	$\beta$ -казеиновый промотор (коза) + инсулятор	Коза/МИ	10.8	[22]
–“–	$\alpha$ S1-казеиновый промотор (корова)	Корова/МИ	3	[23]
кДНК	$\beta$ -казеиновый промотор (коза) + инсулятор	Коза/МИ	0.7	[24]
кДНК	$\alpha$ S1-казеиновый промотор (корова)	Мышь/МИ	0.036	[25]
–“–	$\beta$ -казеиновый промотор (коза) + инсулятор	Мышь/МИ	4	[26]
<b>Лизоцим</b>				
кДНК	$\beta$ -казеиновый промотор (коза) + инсулятор	Корова/ПЯ	0.026	[17]
–“–	$\beta$ -казеиновый промотор (коза) + инсулятор	Свинья/ПЯ	0.00032	[27]
–“–	$\alpha$ S1-казеиновый (корова)	Коза/МИ	0.27	[28]
–“–	$\alpha$ S1-казеиновый (корова)	Мышь/МИ	0.00071	[29]
<b><math>\alpha</math>-Лактальбумин</b>				
Нативный ген	Бакмида	Корова/ПЯ	1.55	[30]

дукции целевого белка по сравнению с использованием кДНК [32, 33]. Например, в нескольких независимых исследованиях ген лактоферрина человека экспрессировали с использованием одного и того же вектора рВС1 (рис. 2Б). Если для получения ТЖ использовали кДНК, то концентрация рекомбинантного лактоферрина не превышала 4 мг/мл в молоке мышей и 0.7 мг/мл – в молоке трансгенных коз (табл. 1). При использовании нативного гена лактоферрина с интронами, длина которого составляет 50 т.п.н., получили трансгенных мышей, концентрация рекомбинантного лактоферрина в молоке которых достигала 160 мг/мл (табл. 1). Получены также трансгенные козы, содержащие одну копию конструкции, но экспрессирующие в молоке до 10 мг/мл рекомбинантного лактоферрина человека [22]. Аналогичной была разница в экспрессии рекомбинантного лактоферрина при использовании  $\alpha$ S1-казеинового промотора коров (табл. 1). Этот пример показывает, что присутствие интронов в кодирующей области трансгена примерно на порядок увеличивает содержание целевого белка в молоке.

Значительную роль в обеспечении эффективности экспрессии трансгена играет район интеграции конструкции в геном. Инъецированная ДНК обычно встраивается в области, бедные генами, в которых чаще происходят разрывы ДНК [13]. В таких райо-

нах хроматин обычно негативно влияет на экспрессию трансгена, встроенного поблизости. Кроме того, в один геномный сайт часто встраиваются несколько копий конструкции, что может, в свою очередь, приводить к репрессии транскрипции в результате формирования гетерохроматина на повторяющихся последовательностях.

Для защиты экспрессии трансгена от репрессии и поддержания прямой зависимости между количеством копий и уровнем экспрессии трансгена в культурах клеток млекопитающих используется ряд регуляторных элементов: А/Т-богатые участки ДНК, которые связываются с фракцией ядерного матрикса, названные MAR/SAR-элементами [34, 35]; регуляторные элементы (UCOE), активирующие промоторы генов «домашнего хозяйства» [36]; STAR-элементы, способные блокировать распространение гетерохроматина [37]; инсуляторы [38, 39].

Из всех перечисленных регуляторных элементов в векторных конструкциях для получения ТЖ используют только инсуляторы. Инсуляторами называют регуляторные элементы, которые блокируют взаимодействие между энхансером и промотором, если находятся между ними [40, 41]. Кроме того, часть инсуляторов способна служить границей между транскрипционно активным хроматином и гетерохроматином. Один из наиболее хорошо изученных

инсуляторов позвоночных – инсулятор из кластера  $\beta$ -глобиновых генов кур (HS4-инсулятор), размером 1200 п.н., расположенный на 5'-конце  $\beta$ -глобинового локуса [42]. В нем выявлен коровый участок длиной 250 п.н., обладающий полной инсуляторной активностью. В данном участке идентифицирован сайт связывания белка CTCF, единственного охарактеризованного инсуляторного белка позвоночных [43]. CTCF отвечает за способность HS4-инсулятора блокировать энхансеры и помогает связываться с инсулятором белкам USF1 и USF2, которые формируют границу между активным хроматином и гетерохроматином [44]. Также с последовательностью HS4-инсулятора связывается белок BGP1/Vezf1 [45], защищающий GC-богатые последовательности инсулятора от метилирования, которое приводит к нарушению связывания инсуляторных белков с ДНК и, как следствие, к инактивации инсулятора. Согласно существующей модели, BGP1/Vezf1 также терминирует слабую транскрипцию, распространяющуюся из гетерохроматинового района, что может играть важную роль в защите  $\beta$ -глобинового локуса от распространения неактивного хроматина [46]. Созданный компанией «Invitrogen» (США) для получения ТЖ вектор рBC1 содержит две копии HS4-инсулятора длиной 1.2 т.п.н. на 5'-конце вектора (рис. 2Б). Детальный анализ влияния HS4-инсулятора на транскрипционную активность нескольких промоторов, в том числе  $\beta$ -казеинового промотора коз и WAP-промотора кроликов, показал, что инсулятор значительно повышает уровень экспрессии трансгена и количество трансгенных линий, в которых наблюдается значимая продукция целевого белка [22, 47–50]. В то же время HS4-инсулятор не влияет на вариабельность экспрессии трансгена и его эктопическую экспрессию в других тканях организма, не обеспечивает прямую зависимость между числом копий трансгена и уровнем его экспрессии. Таким образом, HS4-инсулятор выполняет роль универсального усилителя транскрипции, который можно использовать для увеличения активности слабых промоторов. Однако он не позволяет добиться эффективной экспрессии трансгена только в молочной железе, что важно для продукции многих целевых белков, негативно воздействующих на здоровье ТЖ.

Возможной альтернативой инсуляторам и другим регуляторным элементам может быть увеличение размера регуляторных последовательностей в трансгенной конструкции. Многие локусы, экспрессирующие гены белков молока, имеют протяженные 5'- и 3'-области, которые могут содержать как тканеспецифичные энхансеры, так и инсуляторы, способные обеспечивать защиту от влияния окружающих генов. Например, создана конструкция размером 50 т.п.н., в составе

которой кодирующая часть (3 т.п.н.) гена WAP мыши, состоящая из 24 т.п.н., была заменена на структурную часть гена лактоферрина человека длиной 29 т.п.н. [21]. В результате получили трансгенных мышей, в молочной железе которых наблюдалась высокая тканеспецифичная экспрессия трансгена, а продукция рекомбинантного лактоферрина человека достигала в молоке 30 мг/мл (табл. 1).

Еще один способ получения ТЖ, эффективно продуцирующих целевые белки, – интеграция в геном больших участков ДНК, достигающих 250 т.п.н. Для подготовки таких протяженных генных конструкций можно использовать векторы на основе бактериальных искусственных хромосом (бакмид), позволяющих проводить клонирование последовательностей размером до 400 т.п.н. [51, 52]. Регуляторные участки тканеспецифичных генов могут занимать большие геномные области и находиться в составе соседних генов. Например, несколько энхансеров, стимулирующих ген WAP свиньи, удалены на 140 т.п.н. от регулируемого ими гена и отделены от него другими генами [53]. При использовании больших фрагментов ДНК можно с высокой долей вероятности считать, что все регуляторные элементы данного гена включены в трансген. Предполагается, что при использовании такого подхода трансген специфично экспрессируется только в молочной железе, и влияние окружающего хроматина на экспрессию трансгена сводится к минимуму. Этот подход позволяет получить ТЖ, экспрессия трансгена в которых максимально соответствует экспрессии эндогенного аналога. Например, при помощи такого метода получены трансгенные коровы, экспрессирующие гены лактоферрина и  $\alpha$ -лактальбумина человека (табл. 1). В целом этот метод позволяет добиться стабильной экспрессии трансгена на уровне нативного гена. Так, в трансгенных коровах продукция лактоферрина и альфа-лактальбумина достигала 3.4 и 1.55 мг/мл соответственно (табл. 1). Проблему представляют другие гены, которые входят в состав бакмиды и экспрессия которых может негативно влиять на здоровье ТЖ. Также необходимо отметить, что использование бакмиды не полностью подавляет влияние геномного окружения: экспрессия остается частично зависимой от места интеграции в геном [54, 55]. При этом не наблюдается прямой зависимости между числом копий бакмиды и уровнем экспрессии. Это может быть связано с тем, что запускаемая РНК-интерференция негативно влияет на экспрессию генов в бакмиде.

### ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

С начала 1990-х годов предпринимались попытки получения ТЖ, продуцирующих различные бел-

ки человека. В настоящее время эти белки нарабатывают в других системах экспрессии (бактериях, дрожжах, клетках млекопитающих). Большую часть рекомбинантных белков человека, которые производятся в культурах клеток млекопитающих, составляют белки плазмы крови [56]. Использование рекомбинантных белков плазмы крови растет с каждым годом, так как расширяется сфера их применения, а использование тканей человека для выделения нативных белков ограничено из-за существующего риска вирусной контаминации, малого числа доноров и этических причин. Факторы свертывания крови VII, VIII и IX применяют для пожизненной терапии наследственных заболеваний. Несмотря на высокий уровень очистки белков, получаемых в бактериальных или дрожжевых системах, со временем у большинства больных возникает иммунный ответ на терапию, что обуславливает необходимость замены препарата на аналогичный, но произведенный другим способом. Поэтому продукция рекомбинантных факторов свертывания крови в молоке ТЖ имеет важное медицинское значение [57]. В табл. 2 приведены некоторые примеры ТЖ, в молоке которых содержатся факторы свертывания крови человека. В большей части случаев для терапии заболеваний крови необходимо сравнительно небольшое количество (исчисляемое граммами) РБ. Вследствие этого оптимальным ТЖ для производства РБ считается кролик: от каждой трансгенной крольчихи можно получить около 5 л молока за лактацию или 20 г РБ в год. Полученные результаты показывают, что экспрессия факторов свертывания крови не влияет на здоровье и лактацию животных [74, 75].

В отличие от факторов свертывания крови VII, VIII и IX, потребности в рекомбинантном альбумине исчисляются тоннами, так как альбумин, помимо медицины, используется в биотехнологии для стабилизации других белков. Альбумин – основной белок крови, который обычно выделяют из плазмы. Производство рекомбинантного альбумина дороже выделения его из плазмы крови, так как для медицинских целей необходима очень высокая степень очистки. В настоящее время рекомбинантный альбумин преимущественно производится в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* (Recombumin™) и *Pichia pastoris* (Albrec™). Огромные потребности в рекомбинантном альбумине определили выбор трансгенных коров для его производства. Так, недавно GTC Biotherapeutics (США) получила трансгенных коров, продукция рекомбинантного альбумина человека (рчАБ) в молоке которых в среднем составила 1–5 мг/мл [15] или до 30 кг на одну корову-производителя в год. В той же работе была описана одна линия трансгенных коров, в молоке которых концентрация

рчАБ достигала 48 мг/мл, что определялось интеграцией 250 копий конструкции. Трансгенные коровы этой линии обладали более коротким периодом лактации и снижением удоя, поэтому можно предположить, что продукция рчАБ в молоке трансгенных коров должна быть ниже 48 мг/мл.

Некоторые белки, такие, как гормоны и цитокины, негативно влияют на лактацию и здоровье ТЖ. В результате возникает проблема с поддержанием трансгенного стада. Наиболее показательным является проект, осуществляемый фирмой «PharmAthene Inc.» (США) по заданию Министерства обороны США, по получению бутирилхолинэстеразы (табл. 2), высокоактивного фермента, эффективно защищающего от фосфорорганических отравляющих веществ. В результате получено стадо коз, в котором уровень рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека (рчБХЭ) в молоке составлял 1–5 мг/мл [59]. Основная проблема, с которой столкнулась компания, – влияние рчБХЭ на лактацию, что значительно снизило продуктивность трансгенных коз [76]. В результате встал вопрос об экономической целесообразности использования трансгенных коз для получения рчБХЭ.

Существует несколько подходов, при помощи которых удастся продуцировать РБ, негативно влияющие на лактацию и здоровье ТЖ, однако они только частично решают проблему. Во-первых, можно найти промотор, который стабильно работает исключительно в молочной железе на достаточно низком уровне. Например, с использованием промотора гена  $\beta$ -казеина без энхансера (табл. 2) в трансгенных козах продуцировали рекомбинантный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека (рчГ-КСФ) [60]. Однако концентрация рчГ-КСФ в молоке этих коз не превышала 0.05 мг/мл. Были также получены трансгенные мыши, молоко которых содержало 0.02–0.04 мг/мл рчГ-КСФ. Использовали также экспрессирующий вектор, содержащий 5'-регуляторную область гена *CSN1S1* козы (3387 п.н.), включающую первый интрон, и 3'-область гена *CSN1S1* коровы (1518 п.н.) с некодирующими экзонами 18 и 19 [67]. В результате показали, что в трансгенных мышцах, несущих этот вектор, рчГ-КСФ экспрессируется только в молоке, но не в других тканях. Однако низкий уровень РБ в молоке снижает экономическую привлекательность данного подхода.

Альтернативным способом получения РБ, негативно влияющих на здоровье ТЖ, является заражение молочной железы векторами на основе аденовирусов, дефектных по репликации. Например, в лаборатории трансгенеза и клонирования животных (Гавана, Куба) получили аденовирусный вектор, предназначенный для экспрессии рекомбинантного эритропоэ-

Таблица 2. Примеры экспрессии рекомбинантных белков (РБ) человека в молоке трансгенных животных (ТЖ)

РБ (конструкция)	Регуляторные элементы	ТЖ/способ получения	Максимальный уровень экспрессии РБ в молоке, мг/мл	Ссылка
Альбумин (нативный ген)	β-казеиновый промотор (коза) + инсулятор	Корова/ПЯ	40	[15]
Альфа-фетопротеин (нативный ген)	β-казеиновый промотор (коза) + инсулятор	Коза/ПЯ	1.1	[58]
Бутирилхолинэстераза (кДНК)	—“—	Коза/ПЯ	5	[59]
Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (нативный ген)	—“—	Коза/МИ	0.05	[60]
Гормон роста (нативный ген)	β-казеиновый промотор (коза)	Коза/ПЯ	0.07	[61]
Антитромбин (кДНК)	β-казеиновый промотор (коза)	Коза/МИ	2	[62]
Фактор свертывания крови IX (мини-ген)	—“—	Мышь/МИ	0.026	[63]
Тканевый активатор плазминогена (кДНК)	—“—	Коза/МИ	3	[64]
Фактор свертывания крови IX (кДНК)	β-казеиновый промотор (корова)	Коза/МИ	$9.5 \times 10^{-5}$	[65]
Гормон роста (нативный ген)	β-казеиновый промотор (корова)	Корова/ПЯ	5	[66]
Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (нативный ген)	αS1-казеиновый промотор (коза)	Мышь/МИ	0.04	[67]
Эритропоэтин (кДНК)	β-лактоглобулиновый промотор (корова)	Мышь/кролик /МИ	0.3 (мышь) 0.5 (кролик)	[68]
Лизостафин (нативный ген)	β-лактоглобулиновый промотор (овца)	Корова/ПЯ	0.014	[69]
Лизостафин (кДНК)	β-лактоглобулиновый промотор (овца)	Мышь/МИ	1.3	[70]
C1-ингибитор эстеразы (нативный ген)	WAP-промотор (мышь)	Кролик/МИ	1.8	[71]
Фактор свертывания крови IX (кДНК)	WAP-промотор (мышь)	Свинья/МИ	4	[72]
Фактор свертывания крови VIII (кДНК)	WAP-промотор (мышь)	Кролик/МИ	0.1	[73, 74]

тина человека. В молоке зараженных этим аденовирусом коз концентрация эритропоэтина достигала 2 мг/мл, но он обладал низкой биологической активностью, что, как полагают, связано с недостаточным уровнем гликозилирования белка, полученного таким способом [77]. Описано получение с помощью аденовирусных векторов рекомбинантного гормона роста человека в мышах (2 мг/мл) и козах (0.3 мг/мл) [78]. Аналогичный подход использовали и в случае рекомбинантного лактоферрина человека, концентрация которого в молоке коз достигала 2 мг/мл [79]. Несмотря на простоту получения с помощью аденовирусного вектора животных, экспрессирующих целевой белок в молоке, этот метод не позволяет обеспечить стабильную экспрессию рекомбинантного белка

на уровне, достаточном для его промышленного производства. Высокий уровень экспрессии (1.5–2 мг/мл) наблюдался только в течение первых 25 дней лактации, что можно объяснить либо естественным отмиранием трансфицированных клеток, либо иммунным ответом на инфекцию.

Наконец, перспективным способом считается продукция белков в неактивной форме. Например, для получения рекомбинантного эритропоэтина человека создан экспрессирующий вектор, в котором кДНК эритропоэтина встроена в пятый экзон гена лактоглобулина коров [68] таким образом, чтобы между кодирующими областями двух генов находился участок, расщепляемый IgA-протеазой. В результате были получены трансгенные мыши и кролики,



в молоке которых концентрация химерного белка достигала 0.3 и 0.5 мг/мл соответственно. После разрезания химерного белка IgA-протеазой активность эритропоэтина восстанавливалась, при этом лактация и здоровье ТЖ не нарушились. Возможно также использовать коэкспрессию РБ и ингибитора, блокирующего его активность. Так, экспрессируемая в молоке рекомбинантная проурокиназа человека почти сразу же превращается в активную форму – урокиназу, что делает такой биореактор бесперспективным для получения лекарственной формы белка (проурокиназы). Для решения этой проблемы проурокиназу коэкспрессировали в молоке трансгенных мышей с бактериальным ингибитором сериновых протеаз [80]. Это позволило очистить молоко трансгенных мышей от процессированной проурокиназы (урокиназы) и резко повысить выход лекарственной формы этого белка.

Необходимо отметить, что сиалирование РБ в молоке трансгенных кроликов и свиней наиболее сходно с сиалированием в клетках человека, что имеет принципиальное значение для снижения иммуногенности препаратов при длительной терапии [81, 82]. В молоке же трансгенных коз и коров могут происходить неправильные посттрансляционные модификации, снижающие активность рекомбинантного белка. Наиболее простой способ удаления неправильной модификации – мутирование в белке сайта, по которому происходит нежелательная модификация. Например, альфа-фетопротеин, одноцепочечный гликозилированный белок 68 кДа сыворотки крови, используется в терапии аутоиммунных заболеваний. Потребность в правильно свернутом рекомбинантном альфа-фетопротеине человека (рчАФП) очень высока (требуются килограммы белка), поэтому компания «Merrimack Pharma» (США) совместно с «GTC Biotherapeutics» (США) запустила проект по получению трансгенных коз, продуцирующих с молоком рчАФП. Альфа-фетопротеин человека, выделенный из молока трансгенных коз, оказался гликозилированным по остатку аспарагина в положении 233, что значительно снижало его активность. Поэтому в рчАФП заменили остаток аспарагина на глутамин, что привело к инаktivации сайта гликозилирования [58, 83]. При этом показано, что биологическая активность и фармакокинетика мутантного варианта альфа-фетопротеина были такими же, как у нативного белка.

Рынок МАТ относится к наиболее быстро развивающимся сегментам фармацевтической индустрии. В 2007 году терапевтические МАТ, основная часть которых применяется при онкологических и аутоиммунных заболеваниях, принесли биотехнологическим компаниям США более 26 млрд долларов [84].

В настоящее время используемые в медицине МАТ производятся исключительно в культурах клеток млекопитающих, так как для терапевтической эффективности необходимы правильные посттрансляционные модификации МАТ. К наиболее важным модификациям относятся присоединение олигосахаридов и сиаловой кислоты, которые значительно увеличивают время циркуляции МАТ в кровеносном русле и снижают их иммуногенность. Однако РБ, получаемые в культурах клеток, имеют сравнительно высокую себестоимость. Поэтому в конце 1990-х годов была предпринята попытка использования ТЖ в качестве продуцентов антител [85, 86]. Так как МАТ состоят из двух полипептидных цепей, то для их экспрессии в ТЖ использовались две конструкции, которые содержали гены, кодирующие тяжелую и легкую субъединицы. Обычно при получении ТЖ в один геномный сайт встраивается несколько конструкций, кодирующих тяжелую и легкую цепь антител. В первых работах МАТ экспрессировали с использованием различных промоторов генов белков молока, например, β-лактоглобулина овцы [87] и WAP мыши [88, 89]. В результате получили трансгенных мышей, в молоке которых содержались МАТ в достаточно высоких концентрациях 0.4–5 мг/мл (табл. 3). В дальнейшем МАТ с целью создания фармацевтического производства получали в трансгенных козах, а для тестирования экспрессионных векторов, качества МАТ и отработки метода их выделения использовали трансгенных мышей. При этом для экспрессии МАТ получил распространение описанный выше вектор рBC1 (рис. 2Б). С помощью этого вектора получены наиболее высокие уровни экспрессии МАТ в трансгенных мышцах, достигавшие 32 мг/мл молока (табл. 3). Однако данные по уровню экспрессии МАТ в молоке трансгенных коз в открытой печати практически отсутствуют. Только в одном обзоре [86] упоминаются трансгенные козы, у одной из которых уровень экспрессии достигал 14 мг/мл.

Согласно данным фирмы «GTC Biotherapeutics» (США), МАТ, выделенные из молока трансгенных коз, обычно бывают стабильными и высокоэффективными, причем даже высокий уровень экспрессии МАТ не влияет на здоровье и лактацию трансгенных коз. Фирмой разработаны достаточно простые методы получения высокоочищенных МАТ, пригодных для использования в медицинских целях [95, 96]. Проведенные исследования позволяют считать трансгенных коз оптимальными для производства МАТ [97]. Привлекательность трансгенных коз обусловлена также тем, что они реже болеют коровьим бешенством по сравнению с овцами и коровами. В настоящее время для производства РБ из молока трансгенных коз используют животных из Новой Зеландии или Ав-

Таблица 3. Примеры продукции мАТ в молоке трансгенных животных (ТЖ)

Антиген, с которым связывается антитело	Регуляторные элементы	ТЖ/конструкции	Максимальный уровень продукции антител в молоке, мг/мл	Ссылка
CD6-рецептор	WAP-промотор (кролик)	Мышь/два нативных гена	0.4	[90]
S-гликопротеин оболочки (коронавирус гастроэнтерита)	WAP-промотор (мышь)	Мышь/два нативных гена	5	[89]
S-гликопротеин оболочки (вирус гастроэнтерита)	$\beta$ -лактоглобулиновый промотор (овца)	Мышь/две кДНК	6	[91]
BR96 анти-Lewis Y	$\beta$ -казеиновый промотор (коза)	Мышь/два нативных гена	14	[86]
BR96 анти-Lewis Y	$\beta$ -казеиновый промотор (коза)	Мышь/два нативных гена	4	[86]
CD20-рецептор	$\beta$ -казеиновый промотор (коза) + инсулятор	—“—	22.3	[92]
Антиген белка оболочки (вирус гепатита А)	$\beta$ -казеиновый промотор (коза) + инсулятор	—“—	32	[93]
B-антиген белка оболочки (вирус гепатита В)	—“—	—“—	17.8	[94]

стралии, так как официально считается, что в этих странах коровьего бешенства нет.

В настоящее время потребность во многих мАТ достигает нескольких сотен килограмм в год. Так, мировые потребности в мАТ к рецептору CD20 превышают 600 кг в год. Подсчитано, что стадо, состоящее из 210 трансгенных коз, в молоке которых содержится мАТ в концентрации 8 г/л, может полностью обеспечить мировые потребности в мАТ к CD20 с примерной себестоимостью 100 \$/г [85]. В то же время для получения такого же количества мАТ необходимо 51 000 л клеточной культуры при производительности 1 г/л и примерной себестоимости 300 \$/г.

Несмотря на сравнительно низкую себестоимость производства мАТ в трансгенных козах, существует ряд недостатков в их использовании по сравнению с культурами клеток млекопитающих. Во-первых, антитела должны быть правильно гликозилированы и сиалированы, что имеет важное значение для их стабильности, иммуногенности и биологической активности. В молочных железах трансгенных коз происходит гликозилирование и сиалирование, но оно может быть неполным. Кроме того, с увеличением уровня экспрессии мАТ эффективность гликозилирования падает. Поэтому оптимальным уровнем мАТ в молоке считается 2–4 мг/мл. Вторая проблема состоит в том, что сиаловая кислота в трансгенных козах представлена *N*-ацетилнейраминовой кислотой (NANA) [98], в то время как у людей антитела содержат *N*-гликозилнейраминовую кислоту (NGNA). Существует вероятность того, что антитела с «неправильной» сиаловой кислотой в некоторых случа-

ях могут оказаться иммуногенными для пациентов. В культурах клеток млекопитающих рекомбинантные белки также имеют гетерогенное гликозилирование и сиалирование, и обычно оно не полностью соответствует нативному варианту. Для преодоления этой проблемы в клеточные линии, продуцирующие рекомбинантные белки, вводят дополнительные гены, которые кодируют транспортеры и ферменты, усиливающие уровень гликозилирования и сиалирования, и/или гены, РНК-продукт которых индуцирует инактивацию генов, кодирующих белки, негативно влияющие на гликозилирование [99, 100]. В последнее время с разработкой новых технологий сайт-направленного мутагенеза появилась возможность инактивировать в клеточных линиях гены, вовлеченные в гликозилирование РБ, отличное от гликозилирования в клетках человека. Аналогичные подходы неприменимы для животных-продуцентов, так как изменения в геноме могут негативно отразиться на жизнеспособности ТЖ. Единственный потенциально возможный вариант – создание ТЖ с использованием вектора под строгим контролем экспрессии только в молочной железе. Такой вектор должен экспрессировать дополнительные гены, усиливающие/модифицирующие гликозилирование, и гены, кодирующие группы РНК, способные инактивировать гены, белковые продукты которых ответственны за неправильное гликозилирование РБ. Наконец, проблему при очистке мАТ из молока представляет присутствие в козьем молоке около 0.3–0.5 мг/мл эндогенных иммуноглобулинов. Поэтому для получения высокоочищенных мАТ необходима эффективная хроматографическая стадия

разделения козьих и человеческих иммуноглобулинов [86]. В то же время с внедрением синтетических сред для культивирования клеточных культур заметно упростилась стадия очистки рекомбинантных белков, что несколько снизило себестоимость получения высокоочищенных мАТ.

Недавно показали, что отсутствие фукозы в гликоцепи антитела позволяет индуцировать цитотоксичность при концентрации антитела в десятки раз меньшей, чем при использовании обычных антител [101]. Для получения таких дефукозилированных антител экономически выгодной могла бы стать платформа на основе трансгенных кроликов. Интересно, что в рекомбинантном С1-ингибиторе человека, выделенном из молока трансгенных кроликов, не найдены остатки фукозы, что предполагает отсутствие активного фукозилирования в молочных железах кролика. Таким образом, трансгенные кролики могут стать привлекательной платформой для производства этого нового класса высокоактивных антител.

Широкомасштабный проект по получению мАТ в ТЖ был начат в конце 1990-х годов фирмой «Genzyme Transgenic» (в настоящее время – «GTC Biotherapeutics»), которая заключила контракты с большим числом фирм-разработчиков мАТ как терапевтических средств. На первом этапе мАТ для оценки их общей активности получали в трансгенных мышцах. Если уровень экспрессии и биологическая активность мАТ в трансгенных мышцах соответствовали ожидаемым, то на втором этапе получали коз-продуцентов. В настоящее время компания «GTC Biotherapeutics» разрабатывает технологию производства нескольких широко используемых мАТ (Rituximab®, Herceptin®, Humira® и Erbitux®) в трансгенных козах. Работы по получению мАТ в трансгенных козах также активно ведутся в Китае и Новой Зеландии.

### **ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ**

На данный момент FDA близок к принятию положительного решения по коммерческому использованию лосося, экспрессирующего гормон роста (AquAdvantage), который, согласно заключению, безопасен и для человека, и для окружающей среды [11, 102]. Экономический эффект в случае трансгенного лосося связан с ускорением роста почти в 2 раза, что значительно снижает себестоимость разведения. В связи с этим можно предполагать, что уже в ближайшем будущем будет получено разрешение на коммерческое применение различных ТЖ, с помощью которых могут быть достигнуты такие значимые цели, как 1) получение модифицированного молока, содержащего РБ человека; 2) изменение со-

става молока для увеличения эффективности получения молочных продуктов; 3) улучшение свойств сельскохозяйственных животных (быстрый рост, переработка отходов); 4) повышение устойчивости сельскохозяйственных животных к бактериальным, вирусным и прионным инфекциям [103].

В настоящее время все более актуальной становится проблема искусственного вскармливания новорожденных и питания детей раннего возраста. По своему составу грудное молоко значительно отличается от козьего и коровьего. Так, в молоке человека намного выше концентрация лактоферрина (2.0–5.8 мг/мл), лизоцима (0.03–3 мг/мл) и лактальбумина (1.8–3.1 мг/мл). Эти белки защищают организм от инфекций, улучшают структуру эпителия кишечника, положительно влияют на микрофлору кишечника и усиливают иммунитет. В то же время концентрация этих белков в коровьем молоке намного ниже: 0.03–0.49 мг/мл лактоферрина, 0.05–0.22 мг/мл лизоцима и 1.47 мг/мл лактальбумина. Смеси для искусственного вскармливания, изготовленные на основе молока животных, не обеспечивают оптимального питания младенцев, поскольку готовятся на основе гидролизатов и не содержат функциональных белков.

В Китае для получения модифицированного молока получили трансгенных коров, которые экспрессируют рекомбинантный лактоферрин (3.4 мг/мл) [16], лизоцим (0.03 мг/мл) [17] или лактальбумин человека (1.5 мг/мл) [33]. В дальнейшем планируется начать производство молока, которое содержит все три РБ человека в оптимальной концентрации. В США получены трансгенные козы, молоко которых содержит рекомбинантный лизоцим человека в концентрации 0.27 мг/мл [31], что составляет 67% от концентрации лизоцима в грудном молоке. Показано, что пастеризованное молоко с лизоцимом человека положительно влияет на здоровье молодняка коз и свиней [104, 105]. В настоящее время Университет Дэвиса (США) совместно с Институтом биомедицины федерального университета Сeará (Бразилия) получил грант от правительства Бразилии для изучения возможности использования молока, содержащего рекомбинантный лизоцимом человека, при диарее у детей из малообеспеченных семей. Также планируется получить трансгенных коз, экспрессирующих в молоке рекомбинантный лактоферрин, для последующего производства молока, содержащего одновременно два белка человека.

Новозеландская государственная компания «AgroResearch» создает трансгенных коров с целью повышения эффективности получения сыров. Примерно 80% белков молока составляют наиболее ценные белки – казеины. При этом фракция казеинов ко-

ровьего молока состоит из  $\alpha S1$ -,  $\alpha S2$ -,  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеинов, кодируемых одной копией гена каждый [106]. Казеины агрегируют в большие мицеллы. Мицеллярная структура и ее стабильность могут меняться в зависимости от соотношения казеинов, что влияет на физико-химические свойства молока. Сыр образуется путем агрегации казеиновых мицелл, которые, формируя белковую сеть, задерживают воду и жир. Увеличенное содержание  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеинов приводит к уменьшению размера мицелл и повышает температурную устойчивость, что необходимо для производства сыра [107]. С целью увеличения количества  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеинов в молоке были получены трансгенные коровы, содержащие дополнительные копии соответствующих генов [108]. При этом использовали эндогенный ген  $\beta$ -казеина коров с его регуляторными последовательностями. Так как ген  $\kappa$ -казеина обладает сравнительно низким уровнем экспрессии, то для получения трансгенных коров использовали химерный ген, содержащий регуляторную область гена  $\beta$ -казеина и кодирующую часть гена  $\kappa$ -казеина. В результате получили трансгенных коров, в молоке которых уровень  $\beta$ -казеина был увеличен на 20%, а  $\kappa$ -казеина – в 2 раза. Этот результат наглядно показывает возможность изменения состава молока методом трансгенеза, что может повысить эффективность многомиллиардного сырного производства.

Одной из проблем свиноводства является высокая смертность поросят, обусловленная недостатком  $\alpha$ -лактальбумина в молоке. Для решения этой проблемы получили трансгенных свиней, в геном которых был встроены ген  $\alpha$ -лактальбумина коров, что привело к увеличению концентрации лактозы в молоке [109]. В результате значительно снизилась смертность поросят, вскормленных модифицированным молоком. Другая проблема свиноводства – загрязнение окружающей среды их фекалиями, содержащими высокую концентрацию фосфора. Для решения этой проблемы получили трансгенных свиней, в геном которых был встроены бактериальный ген, кодирующий фитазу [110]. В результате уровень фосфатов в фекалиях трансгенных свиней снизился на 75%.

Устойчивость к заболеваниям – другой чрезвычайно важный аспект применения трансгенеза в сельском хозяйстве. Так ущерб от мастита (воспаления молочной железы, вызванного бактериальной инфекцией) крупного рогатого скота только в США составляет более 1.7 млрд долларов в год [111]. Обычно мастит вызывается стафилококками. Бактерицидным эффектом против стафилококков, вызывающих мастит, обладает лизостафин – мощная пептидогликангидролаза, секретируемая *Staphylococcus simulans*. Были получены трансгенные коровы [69], в молоке которых содержался лизостафин (на уровне

0.014 мг/мл). Показано, что у таких коров повысилась устойчивость к стафилококковым инфекциям.

Наиболее опасное заболевание крупного рогатого скота в странах северного полушария – синдром губчатой энцефалопатии, известный также как коровье бешенство. Для борьбы с этим заболеванием предложено удалять ген прионного белка [112], который вызывает заболевание. В результате получили трансгенных коров без этого гена, которые обладали устойчивостью к заражению коровьим бешенством [113]. Очевидно, что использование таких коров может снизить вероятность появления и распространения эпидемий коровьего бешенства.

Приведенные примеры показывают перспективность использования ТЖ в сельском хозяйстве. Основной фактор, сдерживающий распространение ТЖ, – это опасение населения по поводу безопасности трансгенных продуктов. Из-за этого ужесточаются требования регулирующих органов, что усложняет получение разрешения на использование ТЖ. В 2009 году (действующая редакция от 17 мая 2011 года), после более чем 10 лет работы, в FDA была разработана процедура рассмотрения заявок на использование ТЖ [114]. В развивающихся странах процедура одобрения новых продуктов проще, а власти и население лучше относятся к ТЖ, как к одному из способов решения проблемы обеспечения продовольствием и повышения уровня жизни населения. Вследствие этого большинство проектов по использованию ТЖ в сельском хозяйстве в настоящее время осуществляются в таких странах, как Бразилия, Аргентина и Китай.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние 20 лет созданы эффективные технологии получения ТЖ – продуцентов РБ. ТЖ открывают возможности значительного снижения себестоимости производства МАТ и РБ человека с посттрансляционными модификациями, очень близкими к модификациям в белках человека.

До последнего времени основными причинами, по которым в развитых странах не производили РБ с использованием ТЖ, были отсутствие разработанного законодательства, регулирующего использование ТЖ, строгие этические нормы и протесты населения против использования животных в качестве биореакторов.

Однако в настоящее время ситуация начинает меняться – разработаны подробные правила, регламентирующие использование ТЖ для производства РБ. Создание двух одобренных регуляторными органами США и Евросоюза производств РБ из молока ТЖ сняло многие вопросы, связанные с организацией производства, а истечение срока действия патентов



на многие биопрепараты усилило конкуренцию среди производителей, что заставляет их искать максимально выгодные с экономической точки зрения технологические платформы для производства. Таким образом, можно ожидать, что в ближайшем будущем ТЖ найдут широкое применение в биотехнологической и пищевой промышленности. ●

*Работа поддержана  
ФЦП «Исследования и разработки по  
приоритетным направлениям развития научно-  
технологического комплекса России  
на 2007–2013 годы» (государственные контракты  
№ 16.512.12.2007 и 16.552.11.7067).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Demain A.L., Vaishnav P. // *Biotechnology Advances*. 2009. V. 27. P. 297–306.
2. Durocher Y., Butler M. // *Curr. Opin. Biotech.* 2009. V. 20. P. 700–707.
3. Hammer R.E., Brinster R.L., Rosenfeld M.G., Evans R.M., Mayo K.E. // *Nature*. 1985. V. 315. P. 413–416.
4. Dyck M.K., Lacroix D., Pothier F., Sirard M.A. // *Trends Biotechnol.* 2003. V. 21. P. 394–399.
5. Echelard Y. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1996. V. 7. P. 536–540.
6. Houdebine L.-M. // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2009. V. 32. P. 107–121.
7. Redwan el-R.M. // *J. Immunoassay Immunochem.* 2009. V. 30. P. 262–290.
8. Rudolph N.S. // *TIBTECH*. 1999. V. 17. P. 367–374.
9. Soler E., Thepot D., Rival-Gervier S., Jolivet G., Houdebine L.-M. // *Reprod. Nutr. Dev.* 2006. V. 46. P. 579–588.
10. BIOPHARMA: Biopharmaceutical Products in the US and European Markets. [http://biopharma.fmsdb.com/biopharma7.lasso?S=index&DB\\_test=DD&-nothing](http://biopharma.fmsdb.com/biopharma7.lasso?S=index&DB_test=DD&-nothing)
11. Vázquez-Salat N., Salter B., Smets G., Houdebine L.-M. // *Biotechnology Advances*. 2012. V. 30. № 6. P. 1336–1343.
12. Kues W.A., Niemann H. // *Prev. Vet. Med.* 2011. V. 102. P. 146–156.
13. Goldman I.L., Kadullin S.G., Razin S.V. // *Med. Sci. Monit.* 2004. V. 10. P. RA274–285.
14. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H. // *Nature*. 1997. V. 385. P. 810–813.
15. Echelard Y., Williams J.L., Destrempe M.M., Koster J.A., Overton S.A., Pollock D.P., Rapiejko K.T., Behboodi E., Masiello N.C., Gavin W.G., et al. // *Transgenic Res.* 2009. V. 18. P. 361–376.
16. Yang P., Wang J., Gong G., Sun X., Zhang R., Du Z., Liu Y., Li R., Ding F., Tang B., et al. // *PLoS One*. 2008. V. 3. P. e3453.
17. Whyte J.J., Prather R.S. // *Mol. Reprod. Dev.* 2011. V. 78. P. 879–891.
18. Zhang Y., Yang Z., Yang Y., Wang S., Shi L., Xie W., Sun K., Zou K., Wang L., Xiong J., et al. // *J. Mol. Cell Biol.* 2011. V. 3. P. 132–141.
19. Honaramooz A., Yang Y. // *Vet. Med. Int.* 2010. pii: 657860.
20. Garrels W., Mátés L., Holler S., Dalda A., Taylor U., Petersen B., Niemann H., Izsvák Z., Ivics Z., Kues W.A. // *PLoS One*. 2011. V. 6. P. e23573.
21. Shi G., Chen H., Wu X., Zhou Y., Liu Z., Zheng T., Huang P. // *Transgenic Res.* 2009. V. 18. P. 573–582.
22. Goldman I.L., Georgieva S.G., Gurskiy Ya.G., Krasnov A.N., Deykin A.V., Popov A.N., Ermolkevich T.G., Budzevich A.I., Chernousov A.D., Sadchikova E.R. // *Biochem. Cell Biol.* 2012. V. 90. P. 513–519.
23. van Berkel P.H., Welling M.M., Geerts M., van Veen H.A., Ravensbergen B., Salaheddine M., Pauwels E.K., Pieper F., Nuijens J.H., Nibbering P.H. // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. P. 484–487.
24. Zhang J., Li L., Cai Y., Xu X., Chen J., Wu Y., Yu H., Yu G., Liu S., Zhang A., et al. // *Protein Expression and Purification*. 2008. V. 57. P. 127–135.
25. Platenburg G.J., Kootwijk E.P., Kooiman P.M., Woloshuk S.L., Nuijens J.H., Krimpenfort P.J.A., Pieper F.R., de Boer H.A., Strijker R. // *Transgenic Res.* 1994. V. 3. P. 99–108.
26. Дейкин А.В., Ермолкевич Т.Г., Гольдман И.Л., Гурский Я.Г., Краснов А.Н., Попов А.Н., Георгиева С.Г., Кузнецов С.Л., Деревянко В.Г., Новикова Н.И. и др. // *ДАН*. 2009. Т. 427. С. 545–548.
27. Tong J., Wei H., Liu X., Hu W., Bi M., Wang Y., Li Q., Li N. // *Transgenic Res.* 2011. V. 20. P. 417–419.
28. Maga E.A., Shoemaker C.F., Rowe J.D., BonDurant R.H., Anderson G.B., Murray J.D. // *J. Dairy Sci.* 2006. V. 89. P. 518–524.
29. Maga E.A., Anderson G.B., Huang M.C., Murray J.D. // *Transgenic Res.* 1994. V. 3. P. 36–42.
30. Wang J., Yang P., Tang B., Sun X., Zhang R., Guo C., Gong G., Liu Y., Li R., Zhang L., et al. // *J. Dairy Sci.* 2008. V. 91. P. 4466–4476.
31. Kabotyanski E.B., Rijnkels M., Freeman-Zadrowski C., Buser A.C., Edwards D.P., Rosen J.M. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 22815–22824.
32. Choi T., Huang M., Gorman C., Jaenisch R. // *Mol. Cell Biol.* 1991. V. 11. P. 3070–3074.
33. Whitelaw C.B., Archibald A.L., Harris S., McClenaghan M., Simons J.P., Clark A.J. // *Transgenic Res.* 1991. V. 1. P. 3–13.
34. Girod P.A., Zahn-Zabal M., Mermod N. // *Biotech. Bioeng.* 2005. V. 91. P. 1–11.
35. Girod P.A., Nguyen D.Q., Calabrese D., Puttini S., Grandjean M., Martinet D., Regamey A., Saugy D., Beckmann J.S., Bucher P., et al. // *Nat. Methods*. 2007. V. 4. P. 747–753.
36. Benton T., Chen T., McEntee M., Fox B., King D., Crombie R., Thomas T.C., Bebbington C. // *Cytotechnology*. 2002. V. 38. P. 43–46.
37. Kwaks T.H.J., Barnett P., Hemrika W., Siersma T., Sewalt R.G., Satijn D.P., Brons J.F., van Blokland R., Kwakman P., Kruckeberg A.L., et al. // *Nat. Biotech.* 2003. V. 21. P. 553–558.
38. Kwaks T.H.J., Otte A.P. // *Trends Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 137–142.
39. Recillas-Targa F., Valadez-Graham V., Farrell C.M. // *BioEssays*. 2004. V. 26. P. 796–807.
40. Максименко О., Четверина Д., Георгиев П. // *Генетика*. 2006. Т. 42. С. 845–857.
41. Herold M., Bartkuhn M., Renkawitz R. // *Development*. 2012. V. 139. P. 1045–1057.
42. Chung J.H., Bell A.C., Felsenfeld G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 575–580.
43. Bell A.C., West A.G., Felsenfeld G. // *Cell*. 1999. V. 98. P. 387–396.
44. West A.G., Huang S., Gaszner M., Litt M.D., Felsenfeld G. // *Mol. Cell*. 2004. V. 16. P. 453–463.

45. Dickson J., Gowher H., Strogantsev R., Gaszner M., Hair A., Felsenfeld G., West A.G. // *PLoS Genetics*. 2010. 6:e1000804.
46. Giles K.E., Gowher H., Ghirlando R., Jin C., Felsenfeld G. // *Cold Spring Harbor Symp. Quantitative Biol.* 2010. V. 75. P. 1–7.
47. Giraldo P., Martinez A., Regales L., Lavado A., Garcia-Diaz A., Alonso A., Busturia A., Montoliu L. // *Nucl. Acids. Res.* 2003. V. 31. P. 6290–6305.
48. Giraldo P., Rival-Gervier S., Houdebine L.-M., Montoliu L. // *Transgenic Res.* 2003. V. 12. P. 751–755.
49. Potts W., Tucker D., Wood H., Martin C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. V. 273. P. 1015–1018.
50. Rival-Gervier S., Pantano T., Viglietta C., Maeder C., Prince S., Attal J., Jolivet G., Houdebine L.-M. // *Transgenic Res.* 2003. V. 12. P. 723–730.
51. Chandler K.J., Chandler R.L., Broeckelmann E.M., Hou Y., Southard-Smith E.M., Mortlock D.P. // *Mamm. Genome*. 2007. V. 18. P. 693–708.
52. Tong J., Lillico S.G., Bi M.J., Qing T., Liu X.F., Wang Y.Y., Zheng M., Wang M., Dai Y.P., Bruce C., Whitelaw A., Li N. // *Transgenic Res.* 2011. V. 20. P. 933–938.
53. Saïdi S., Rival-Gervier S., Daniel-Carliier N., Thépot D., Morgenthaler C., Viglietta C., Prince S., Passet B., Houdebine L.-M., Jolivet G. // *Gene*. 2007. V. 401. P. 97–107.
54. Saux A.L., Houdebine L.-M., Jolivet G. // *Transgenic Res.* 2010. V. 19. P. 923–931.
55. van Keuren M., Gavrulina G., Filipiak W., Zeidler M., Saunders T. // *Transgenic Res.* 2009. V. 18. P. 769–785.
56. Burnouf T. // *Vox. Sanguinis*. 2011. V. 100. P. 68–83.
57. Lubon H. // *Biotechnol. Annu. Rev.* 1998. V. 4. P. 1–54.
58. Parker M.H., Birck-Wilson E., Allard G., Masiello N., Day M., Murphy K.P., Paragas V., Silver S., Moody M.D. // *Protein Expr. Purif.* 2004. V. 38. P. 177–183.
59. Huang Y.J., Huang Y., Baldassarre H., Wang B., Lazaris A., Leduc M., Bilodeau A.S., Bellemare A., Côté M., Herskovits P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. P. 13603–13608.
60. Ko J.H., Lee C.S., Kim K.H., Pang M.G., Koo J.S., Fang N., Koo D.B., Oh K.B., Youn W.S., Zheng G.D., et al. // *Transgenic Res.* 2000. V. 9. P. 215–222.
61. Lee C.S., Lee D.S., Fang N.Z., Oh K.B., Shin S.T., Lee K.K. // *Reprod. Dev. Biol.* 2006. V. 30. P. 293–299.
62. Edmunds T., van Patten S.M., Pollock J., Hanson E., Bernasconi R., Higgins E., Manavalan P., Ziomek C., Meade H., McPherson J.M., et al. // *Blood*. 1998. V. 91. P. 4561–4571.
63. Yan J.-B., Wang S., Huang W.-Y., Xiao Y.-P., Ren Z.-R., Huang S.-Z., Zeng Y.-T. // *Biochem. Genet.* 2006. V. 44. P. 349–360.
64. Ebert K.M., DiTullio P., Barry C.A., Schindler J.E., Ayres S.L., Smith T.E., Pellerin L.J., Meade H.M., Denman J., Roberts B. // *Biotechnology (N.Y.)*. 1994. V. 12. P. 699–702.
65. Huang S., Zhang K., Huang Y., Chen M., Li H., Lu D., Lu J., Chen Y., Qiu X., Xue J., et al. // *Chin. Sci. Bull.* 1998. V. 43. P. 1317–1319.
66. Salamone D., Baranao L., Santos C., Bussmann L., Artuso J., Werning C., Prync A., Carbonetto C., Dabsys S., Munar C., et al. // *J. Biotechnol.* 2006. V. 124. P. 469–472.
67. Serova I.A., Dvoryanchikov G.A., Andreeva L.E., Burkov I.A., Dias L.P., Battulin N.R., Smirnov A.V., Serov O.L. // *Transgenic Res.* 2012. V. 21. P. 485–498.
68. Korhonen V.P., Tolvanen M., Hyttinen J.M., Uusi-Oukari M., Sinervirta R., Alhonen L., Jauhiainen M., Jänne O.A., Jänne J. // *Eur. J. Biochem.* 1997. V. 245. P. 482–489.
69. Wall R.J., Powell A.M., Paape M.J., Kerr D.E., Bannerman D.D., Pursel V.G., Wells K.D., Talbot N., Hawk H.W. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 445–451.
70. Kerr D.E., Plaut K., Bramley A.J., Williamson C.M., Lax A.J., Moore K., Wells K.D., Wall R.J. // *Nat. Biotechnol.* 2001. V. 19. P. 66–70.
71. Van Cott K.E., Lubon H., Russell C.G., Butler S.P., Gwazdauska F.C., Knight J., Drohan W.N., Velander W.H. // *Transgenic Res.* 1997. V. 6. P. 203–212.
72. van Cott K.E., Butler S.P., Russel C.G., Subbramanian A., Lubon H., Gwazdauskas F.C., Knight J., Drohan W.N., Velander W.H. // *Biomol. Engineering*. 1999. V. 15. P. 155–160.
73. Chrenek P., Vasicek D., Makarevich A.V., Jurcik R., Suvegova K., Bauer M., Parkanyi V., Rafay J., Batorova A., Paleyanda R.K. // *Transgenic Res.* 2005. V. 14. P. 417–428.
74. Chrenek P., Ryban L., Vetr H., Makarevich A.V., Uhrin P., Paleyanda R.K., Binder B.R. // *Transgenic Res.* 2007. V. 16. P. 353–361.
75. Hiripi L., Makovics F., Halter R., Baranyi M., Paul D., Carnwath J.W., Bosze Z., Niemann H. // *DNA Cell Biol.* 2003. V. 22. P. 41–45.
76. Baldassarre H., Deslauriers J., Neveu N., Bordignon V. // *Transgenic Res.* 2011. V. 20. P. 1265–1272.
77. Toledo J.R., Sánchez O., Seguí R.M., García G., Montañez M., Zamora P.A., Rodríguez M.P., Cremata J.A. // *J. Biotechnol.* 2006. V. 123. P. 225–235.
78. Sanchez O., Toledo J.R., Rodriguez M.P., Castro F.O. // *J. Biotechnol.* 2004. V. 114. P. 89–97.
79. Han Z.S., Li Q.W., Zhang Z.Y., Xiao B., Gao D.W., Wu S.Y., Li J., Zhao H.W., Jiang Z.L., Hu J.H. // *Protein Expr. Purif.* 2007. V. 53. P. 225–231.
80. Gursky Y., Bibilashvili R., Minashkin M., Krasnov A., Deikin A., Ermolkevich T., Popov A., Verbovaya L., Rutkevich N., Shevelev A., et al. // *Transgenic Res.* 2009. V. 18. P. 747–756.
81. Gil G.-C., Velander W.H., van Cott K.E. // *Glycobiology*. 2008. V. 18. P. 526–539.
82. Koles K., van Berkel P.H., Pieper F.R., Nuijens J.H., Manne M.L., Vliegthart J.F., Kamerling J.P. // *Glycobiology*. 2004. V. 14. P. 51–64.
83. Parkera M.H., Birck-Wilson E., Allard G., Masiello N., Dayb M., Murphya K.P., Paragasa V., Silverb S., Moody M.D. // *Protein Exp. Purif.* 2004. V. 38. P. 177–183.
84. Shukla A.A., Thommes J. // *Trends Biotech.* 2010. V. 28. P. 253–261.
85. Young M.W., Meade H., Curling J.M., Ziomek C.A., Harvey M. // *Res. Immunol.* 1998. V. 149. P. 609–610.
86. Pollock D.P., Kutzko J.P., Birck-Wilson E., Williams J.L., Echelard Y., Meade H.M. // *J. Immunol. Meth.* 1999. V. 231. P. 147–157.
87. Simons J.P., McClenaghan M., Clark A.J. // *Nature*. 1987. V. 328. P. 530–532.
88. Shamay A., Solinas S., Pursel V.G., McKnight R.A., Alexander L., Beattie C., Hennighausen L., Wall R.J. // *J. Anim. Sci.* 1991. V. 69. P. 4552–4562.
89. Castilla J., Pintado B., Sola I., Sanchez-Morgado J.M., Enjuanes L. // *Nat. Biotechnol.* 1998. V. 16. P. 349–354.
90. Limonta J., Pedraza A., Rodriguez A., Freyre F.M., Barral A.M., Castro F.O., Leonart R., Gracia C.A., Gavilondo J.V., de la Fuente J. // *Immunotechnology*. 1995. V. 1. P. 107–113.
91. Sola I., Castilla J., Pintado B., Sanchez-Morgado J.M., Whitelaw C.B., Clark A.J., Enjuanes L. // *J. Virol.* 1998. V. 72. P. 3762–3772.
92. Tang B., Yu S., Zheng M., Ding F., Zhao R., Zhao J., Dai Y., Li N. // *Transgenic Res.* 2008. V. 17. P. 727–732.
93. Zhang R., Rao M., Li C., Cao J., Meng Q., Zheng M., Wang M., Dai Y., Liang M., Li N. // *Transgenic Res.* 2009. V. 18. P. 445–453.
94. Zhang R., Cui D., Wang H., Li C., Yao X., Zhao Y., Liang M., Li N. // *Transgenic Res.* 2012. DOI 10.1007/s11248-012-9589-z

95. Baruah G.L., Belfort G. // *Biotech. & Bioengineering*. 2004. V. 87. P. 274–285.
96. Baruah G.L., Nayak A., Wenkelman E., Belfort G. // *Biotech. & Bioengineering*. 2005. V. 93. P. 747–754.
97. Houdebine L.-M. // *Curr. Opin. Biotech.* 2002. V. 13. P. 625–629.
98. Raju T.S., Briggs J.B., Borge S.M., Jones A.J. // *Glycobiology*. 2000. V. 10. P. 477–486.
99. Bork K., Horstkorte R., Weidemann W. // *J. Pharm. Sci.* 2009. V. 98. P. 3499–3508.
100. Lim Y., Wong N.S.C., Lee Y.Y., Ku S.C.Y., Wong D.C.F. // *Biotech. Appl. Biochem.* 2010. V. 55. P. 175–189.
101. Shinkawa T., Nakamura K., Yamane N., Shoji-Hosaka E., Kanda Y., Sakurada M., Uchida K., Anazawa H., Satoh M., Yamasaki M., et al. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 3466–3473.
102. van Eenennaam A.L., Muir W.M. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. P. 706–710.
103. Murray J.D., Maga E.A. // *Transgenic Res.* 2010. V. 19. P. 357–361.
104. Maga E.A., Cullor J.S., Smith W., Anderson G.B., Murray J.D. // *Foodborne Pathog. Dis.* 2006. V. 3. P. 384–392.
105. Brundige D.R., Maga E.A., Klasing K.C., Murray J.D. // *J. Nutr.* 2008. V. 138. P. 921–926.
106. Karatzas C.N., Turner J.D. // *J. Dairy Sci.* 1997. V. 80. P. 2225–2232.
107. Kang Y., Jimenez-Flores R., Richardson T. // *Basic Life Sci.* 1986. V. 37. P. 95–111.
108. Brophy B., Smolenski G., Wheeler T., Wells D., L’Huillier P., Laible G. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. P. 157–162.
109. Wheeler M.B., Bleck G.T., Donovan S.M. // *Reprod. Suppl.* 2001. V. 58. P. 313–324.
110. Golovan S.P., Meidinger R.G., Ajakaiye A., Cottrill M., Wiederkehr M.Z., Barney D.J., Plante C., Pollard J.W., Fan M.Z., Hayes M.A., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2001. V. 19. P. 741–745.
111. Kerr D.E., Wellnitz O. // *J. Anim. Sci.* 2003. V. 81. P. 38–47.
112. Weissmann C., Enari M., Klöhn P.C., Rossi D., Flechsig E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 16378–16383.
113. Richt J.A., Kasinathan P., Hamir A.N., Castilla J., Sathiyaseelan T., Vargas F. // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 25. P. 132–138.
114. 187 Guidance for Industry Regulation of Genetically Engineered Animals Containing Heritable Recombinant DNA Constructs. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine (CVM). 2009, 2011.