

УДК 577.24

**РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА КЛЕТОК CHO ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ  
В БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ****Н.А. Орлова<sup>1</sup>, Е.А. Гаямова<sup>1</sup>, С.В. Ковнир<sup>1</sup>, Л.К. Даянова<sup>2</sup>, И.И. Воробьев<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup> ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН», Москва, Россия<sup>2</sup> ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Культивируемые клетки млекопитающих позволяют производить не менее половины лекарственных средств на основе рекомбинантных белков, существенную часть вакцин, многие препараты для ветеринарии и реагенты для клинической диагностики. Системы экспрессии на основе линии клеток яичника китайского хомячка (CHO, Chinese hamster ovary) и ее производных используются при получении примерно половины всех терапевтических белков в мире. Для достижения промышленно пригодных уровней экспрессии белков можно проводить оптимизацию генно-инженерных конструкций, кодирующих целевые гены, совершенствовать методы селекции лучших клональных продуцентов, оптимизировать условия культивирования, но наиболее перспективным подходом представляется метаболическая инженерия клеток-хозяев – внедрение или инактивация генов, регулирующих посттрансляционные модификации целевых белков и ростовые характеристики клеток. Исторически инженерия клеток CHO проводилась как ненаправленный мутагенез клеток и отбор линий-ауксотрофов по тому или иному признаку, так были получены линии DUXB-11 и DG-44 с повреждениями аллелей гена дигидрофолатредуктазы (*DHFR*), широко используемые при получении промышленных линий-продуцентов. Для приобретения клеткой-продуцентом новых метаболических свойств, таких как способность вести дополнительные посттрансляционные модификации, обычно вводили дополнительные гены ферментов уже после получения линий-продуцентов целевых белков. Например, для получения продуцента фактора свертывания крови IX человека после отбора клеток с многокопийной вставкой гена целевого белка, мы вводили дополнительный ген фурина человека – сайт-специфической протеазы, отщепляющей пропептид, а также дополнительные копии гена эпоксид редуктазы витамина К (*VKORC1*) китайского хомячка, что потребовало проведения дополнительного раунда клонирования клеток. С появлением технологии направленного редактирования генома при помощи сайт-специфических нуклеаз, а затем – при помощи системы CRISPR/Cas9, стало возможно точечное удаление целевых генов. Одновременное (мультиплексное) редактирование нескольких генов, ставшее возможным только для систем CRISPR/Cas, позволяет получить генетически усовершенствованные клетки за один-два шага редактирования-отбора, уменьшая вероятность накопления нецелевых мутаций, возникающих из-за неспецифического (off-target) срабатывания геномной нуклеазы.

При помощи пары разных гидовых РНК (гРНК), направленных к одному экзону гена *DGFR* на базе сублинии CHO S нами была получена клональная линия клеток A11 с гомозиготным нокаутом гена *DHFR*. Методом мультиплексного редактирования генов *DHFR*, *GLUL*, *BAK1*, *BAX* клеток линии CHO S мы получили линию 10.22, в которой были инактивированы оба аллеля генов *GLUL*, *BAX*, *BAK1* и один аллель гена *DHFR*. В этой линии мы повторно отредактировали ген *DHFR*, и одновременно с этим ввели гены индуктора формирования аутофагосом Beclin-1 и анти-апоптотического белка Bcl-2 под контролем сильного конститутивного промотора хомячка. Была получена линия CHO-4BGD, обладающая высокой скоростью деления клеток и способная к длительному культивированию без замены культуральной среды. Линия CHO-4BGD обладает в 5 раз более высокой интегральной клеточной плотностью по сравнению с родительской клеточной линией при том же режиме культивирования. Оверэкспрессия генов белков Beclin-1 и Bcl-2 увеличивает интегральную клеточную плотность культуры на 6–10 сутки роста по сравнению с линией клеток 10–22 на 34 % для среды ProCHO 5 (Lonza). Мы предполагаем, что полученную линию CHO-4BGD можно использовать для получения промышленных продуцентов фармацевтических белков различных классов с существенно увеличенной общей продуктивностью.

**Литература**

Ковнир С.В. и др. Высокопродуктивная линия-продуцент фактора свертывания крови IX человека на основе клеток CHO // Acta Naturae. 2018. том 10, № 1, с. 55–69 DOI: 10.32607/20758251–2018–10–151–65

Орлова Н.А. и др. Направленная инактивация генов *DHFR*, *GLUL*, *BAK1*, *BAX* методом мультиплексного геномного редактирования клеток CHO // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни – Москва, 2022, том 502, с. 54–59 DOI: 10.31857/S2686738922010188

Ковнир С.В. и др. Нокаут генов *BAX*, *BAK1* и избыточная экспрессия *BCL2*, *BECN1* увеличивают время жизни и максимальную плотность культуры клеток CHO-S // Биотехнология – Москва, 2022, том. 38, № 4 [в печати]