

В.В. Фирстова*, И.Г. Шемякин, И.А. Дятлов

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии,
п. Оболенск, Российская Федерация

Геномное редактирование для оптимизации синтеза и повышения терапевтической эффективности рекомбинантных моноклональных антител

В обзоре приведены общая характеристика терапевтических моноклональных антител; рассмотрены клеточные линии, используемые для их получения; охарактеризованы причины иммуногенности рекомбинантных антител и подходы, используемые для устранения побочных эффектов терапевтических моноклональных антител. Суммированы литературные данные о геномном редактировании клеток-продуцентов моноклональных антител с целью повышения выхода продукта, стабильности экспрессии рекомбинантного белка и снижения его иммуногенности. Проанализированы современные методы сайт-направленной модификации (метод «цинковых пальцев», TALEN и CRISPR/CAS9) для редактирования генома клеточной линии CHO. Проведен анализ выбора стратегии геномного редактирования с учетом достижений омиксных технологий. Рассматриваются подходы к увеличению продолжительности жизни клеток-продуцентов, включая увеличение экспрессии антиапоптотических сигналов и делецию проапоптотических генов, увеличение длительности клеточного цикла клеток в G0/G1-фазе. Описаны подходы, используемые для регулирования посттрансляционной модификации моноклональных антител. Значительное место в обзоре отведено обсуждению особенностей гликозилирования, галактозилирования и сиалирования моноклональных антител в разных системах экспрессии и связанной с ними степенью иммуногенности моноклональных антител. Рассмотрены основные подходы регуляции синтеза моноклональных антител на стадии трансляции с использованием некодирующих РНК.

Ключевые слова: моноклональные антитела, клеточная линия CHO, геномное редактирование, CRISPR/CAS9, некодирующие РНК.

(Для цитирования: Фирстова В.В., Шемякин И.Г., Дятлов И.А. Геномное редактирование для оптимизации синтеза и повышения терапевтической эффективности рекомбинантных моноклональных антител. Вестник РАМН. 2019;74(6):378–387. doi: 10.15690/vramn1113)

Введение

Согласно опубликованным финансовым отчетам, по состоянию на декабрь 2017 г. моноклональные антитела (МКА) продавали 22 компании; объем продаж превысил 98 млрд долларов США, что на 18,3 % больше, чем

в 2016 г. По прогнозам, уровень продаж моноклональных антител к 2022 г. вырастет до 137–200 млрд долларов [1]. Интерес к использованию моноклональных антител в терапии ряда заболеваний обусловлен их высокой аффинностью, т.е. силой взаимодействия веществ, и высокой авидностью — стабильностью комплекса ан-

V.V. Firstova, I.G. Shemyakin, I.A. Dyatlov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology,
Obolensk, Russian Federation

Genome-Editing Techniques to Increase the Therapeutic Efficacy of Monoclonal Antibodies

The review presents a general description of therapeutic monoclonal antibodies, cell lines used to obtain them, characterizes the reasons for the immunogenicity of recombinant antibodies, and approaches used to eliminate the side effects of therapeutic monoclonal antibodies. The focus is on resolving the immunogenicity problems of fully human therapeutic monoclonal antibodies. The most attention are concentrated on the data of antibody-producing cell genomic editing to increase the yield of the product, the stability of expression of the recombinant protein and reduce its immunogenicity. Modern methods of site-directed modification (zinc finger method, TALEN and CRISPR/CAS9) for editing the genome of the CHO cell line are analyzed. The strategies of genomic editing choice carrying out taking into account the advances of omix technologies are discussed. Approaches to increase the life span of producer cells are considered, including an increase in the expression of anti-apoptotic signals and the deletion of proapoptotic genes, an increase in the duration of the cell cycle of cells in the G0/G1 phase. The approaches used to regulate the posttranslational modification of monoclonal antibodies are considered. Significant part of the review are devoted to the discussion of the specificity and differences of glycosylation, galactosylation and sialization of monoclonal antibodies in different expression systems and the associated different degree of immunogenicity of monoclonal antibodies. The main approaches to the regulation of the synthesis of monoclonal antibodies at the stage of translation using non-coding RNA are considered.

Keywords: monoclonal antibodies, CHO cell line, genomic editing, CRISPR/CAS9, non-coding RNA.

(For citation: Firstova VV, Shemyakin IG, Dyatlov IA. Genome-editing techniques to increase the therapeutic efficacy of monoclonal antibodies. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2019;74(6):378–387. doi: 10.15690/vramn1113)

титело–антиген. Для лечения онкологических заболеваний большое внимание направлено на применение биспецифических Fab-антител, первое из которых было зарегистрировано в 2014 г. — Blinatumomab, торговое наименование Blincyto. Отличительной чертой биспецифических антител является разная специфичность каждого из двух Fab-фрагментов одного антитела, что способствует взаимодействию между цитотоксическими Т-клетками и патогенными мишенями (в данном случае — раковыми клетками). В 2017 г. было разрешено к использованию первое полноразмерное биспецифическое гуманизированное моноклональное антитело класса IgG4 (эмицизумаб, торговое название Hemlibra). Всего к концу 2017 г. в Управлении по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) зарегистрировано 57 терапевтических моноклональных антител.

Использование современных технологий и получение полностью человеческих моноклональных антител позволило значительно снизить иммуногенность препаратов, однако возможность проявления побочных эффектов осталась. Например, в марте 2018 г. был запрещен препарат Zinbryta (Biogen, США), предназначенный для терапии рассеянного склероза, после сообщений о провоцировании им менингитов у пациентов. Для минимизации нежелательных эффектов необходимо четко понимать факторы, влияющие на появление побочных эффектов.

Моноклональные антитела: общие сведения

Общая характеристика терапевтических моноклональных антител

Первые терапевтические антитела были мышинными. Однако вскоре было выявлено, что при длительном применении мышинных моноклональных антител у пациентов начинали синтезироваться человеческие антимишьяные антитела (human antimurine antibody, НАМА), которые оказывали нейтрализующий эффект. Для того чтобы снизить иммунный ответ на мышьяные антитела, были разработаны химерные (34 % «мышьяного» содержания) моноклональные антитела, а затем и гуманизированные (5–10 % «мышьяного» содержания). К настоящему времени среди всех терапевтических моноклональных антител 54 % представлены полностью человеческими, которые содержат только генетические последовательности человека, 32 % — гуманизированными и 14 % — химерными. В 2017 г. 2/3 вновь утвержденных FDA моноклональных антител были представлены полностью человеческими антителами. Большинство (79 %) коммерческих терапевтических моноклональных антител принадлежат подклассу иммуноглобулина (immunoglobulin, Ig) G1 и около 70 % несут легкую каппа-цепь. Таким образом, наметилась тенденция к внедрению в терапию полностью человеческих моноклональных антител.

Клеточные линии для получения моноклональных антител

В качестве платформы для получения человеческих моноклональных антител доминирующее место занимают клетки млекопитающих. Это главным образом связано с их уникальной способностью осуществлять посттрансляционную модификацию белков, прежде всего гликозилирование, что необходимо для получения терапевтически эффективных иммуноглобулинов и обеспечения

желаемого периода полужизни моноклональных антител в организме человека.

Ведущее место среди клеток млекопитающих в производстве моноклональных антител занимает технология с использованием клеток яичника китайского хомячка (Chinese hamster ovary, CHO) — 60 %. Для производства рекомбинантных моноклональных антител используются также несекретирующие IgG-линии мышьяных клеток NS0 и Sp2/0. Однако в этих клетках при созревании моноклональных антител начинают экспрессироваться два иммуногенных для человека гликановых эпитопа — галактоза-альфа-1,3-Gal (alpha-gal) и N-гликолил-нейраминавая кислота (Neu5Gc) [2]. Оба эпитопа отсутствуют в клетках линии яичника китайского хомячка и клеточной линии почек детеныша хомяка (baby hamster kidney, ВНК), так же используемую для получения моноклональных антител. Кроме того, выход конечного продукта в зарегистрированных клеточных культурах NS0 обычно в 10 раз ниже по сравнению с культурой клеток яичника китайского хомячка.

В качестве источника получения моноклональных антител рассматривались также клетки эмбриональной почки человека (human embryonic kidney 293, HEK) и PER.C6 (ретинобласт плода, иммортализованный при трансфекции минигеном E1 аденовируса типа 5), в которых гликозилирование белков происходит идентично процессу гликозилирования антител в плазматических клетках человека. Однако использование этих клеточных линий ограничено низким выходом конечного продукта.

Клеточная линия яичника китайского хомячка (CHO):

характеристика, геномное редактирование

Характеристика клеточной линии яичника китайского хомячка

Первоначальная клеточная линия яичника китайского хомячка была получена в 1958 г. из культивируемых клеток яичника самки инбредного китайского хомячка [3]. Клетки линии яичника китайского хомячка характеризуются высокой изменчивостью и на уровне поколений подвергаются сотням тысяч уникальных мутаций. Это приводит к тому, что в клеточной культуре могут появляться мутанты, отличающиеся по генотипу от исходных клеток яичника китайского хомячка. Такие группы родственных клеток называют квазивидами. Различные клеточные линии CHO, такие как CHO-K1, CHO-S и DG44, отличаются по гено- и фенотипу. Степень их родства в структуре генома, составе геномных последовательностей и в паттернах транскрипции не была изучена, и поэтому отсутствуют данные об их сходстве. Если учесть наблюдаемую изменчивость и разнообразие геномных структур в иммортализованных клетках в целом, каждая из вышеупомянутых клеточных линий яичника китайского хомячка представляет собой «квазивид». Этот термин был введен для описания культуральной среды с высокой частотой мутаций клеток, где большая группа пролиферирующих клеток отличается по крайней мере одной мутацией от исходных клеток [4].

Несмотря на высокий уровень мутаций клетки яичника китайского хомячка безопасно использовать в качестве продуцентов моноклональных антител, так как они не переносят патогенных вирусов человека, в их генетический аппарат легко трансформируется ДНК, и они достаточно быстро растут (время удвоения — 14–22 ч). преимуще-

ством использования клеток яичника китайского хомячка в сравнении с клеточными линиями NSO, BNK или HEK-293 являются их более эффективная трансфекция, амплификация генов и селекция высокопродуктивных клонов. Кроме того, клетки яичника китайского хомячка способны расти в высокой концентрации в суспензионной культуре, не образуя агрегатов и осадка [5].

Недостатком при производстве рекомбинантных белков в клеточных линиях яичника китайского хомячка является высокая себестоимость целевого продукта. Для снижения затрат при получении высокопродуктивных клеточных культур исследования проводятся по нескольким направлениям. Первое направление заключается в разработке новых экспрессирующих векторов, содержащих в своем составе регуляторные элементы, обеспечивающие стабильность трансгена в геноме-реципиенте и повышение уровня синтеза белка. Второе направление, которое мы рассмотрим более детально, предполагает редактирование генома клеток-продуцентов яичника китайского хомячка с целью увеличения выхода продукта и улучшения его характеристик.

Геномное редактирование клеток яичника китайского хомячка

Первоначальные попытки редактирования клеток яичника китайского хомячка были связаны с применением метода гомологичной рекомбинации, основанного на случайной интеграции целевого гена в геном с последующим отбором трансгенных клеток. Недостатком этого метода являлось отсутствие контроля за сайтом внедрением генов, что в ряде случаев приводило к нежелательной фенотипической гетерогенности. Для увеличения экспрессии целевых белков использовались методы геной амплификации. Однако полученные таким методом клеточные линии часто нестабильны и показывают снижение продукции с течением времени.

Внедрение трансгенов в специфические сайты генома клеток яичника китайского хомячка контролируемым образом уменьшает вариацию в экспрессии, создавая однородную популяцию со стабильной экспрессией трансгена [6].

На первых этапах контролируемую интеграцию трансгенов проводили с использованием сайт-специфических рекомбиназ, включая системы Cre/loxP и Flp/FRT и интегразу phiC31/R4 [7–9]. Недостаток этих систем заключался в необходимости предварительного создания клеточной линии со вставкой сайта рекомбинации в случайное или ограниченное количество специфических геномных областей клетки.

Появление технологий направленного редактирования генома с применением программируемых нуклеаз предоставило возможность осуществить эффективную и прицельную генетическую сайт-направленную модификацию интересующих мишеней высокоспецифическими нуклеазами. Первым инструментом, используемым для коррекции генома клеток, стала эндонуклеаза, содержащая в своем составе последовательности типа «цинковых пальцев», одна из которых разрезает ДНК, а вторая — связывает. Позже фундаментальные исследования генома прокариот привели к созданию новых инструментов редактирования: TALEN (Transcription Activator Like Effector Nucleases) и CRISPR/CAS9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Обе системы отличаются относительной простотой конструирования. Однако белки TALEN достаточно сложно доставлять внутрь клеток. Проблемой также является возможность непреднамеренных

разрезов ДНК. Более эффективным инструментом редактирования генома является система CRISPR/Cas. Направляющими структурами CRISPR/Cas системы, узнающими специфические последовательности ДНК, являются короткие РНК, а к каталитически неактивному мутантному белку Cas9 присоединяют белки, активирующие или подавляющие функции промоторов, управляющих работой генов. Связывание такого комплекса с целевой ДНК может приводить к стимуляции или подавлению работы целевого гена. Применение CRISPR/Cas системы позволяет получить сайт-специфические разрывы двухцепочечной ДНК, которые могут быть восстановлены путем негомологичной или гомологичной рекомбинации. Гомологичная рекомбинация позволяет осуществлять целевые интеграции с помощью сконструированных нуклеаз в клетки СНО.

Одной из проблем редактирования клеток яичника китайского хомячка является правильный выбор стратегии, который подразумевает четкое представление о функционировании отдельных структурных единиц гена и белков. Прорыв при выборе стратегии редактирования клеток яичника китайского хомячка с целью увеличения их продуктивности при производстве рекомбинантных белков наметился с развитием омиксных технологий, основанных на достижениях геномики, транскриптомики, протеомики и метаболомики (табл.).

Геномное редактирование, направленное на оптимизацию пролиферации и жизнеспособность клеток-продуцентов

Повышение уровня синтеза и стабильности экспрессии рекомбинантных белков в клетках яичника китайского хомячка может быть достигнуто за счет эпигенетической регуляции, в частности частичной инактивации экспрессии гена с помощью метилирования ДНК. Механизмы, лежащие в основе субклональных гетерогенных паттернов экспрессии и нестабильности продукта до конца неясны. Одной из возможных причин снижения экспрессии трансгена может быть снижение копий генов, что приводит к уменьшению транскриптов, вплоть до транскрипционного молчания [25]. Для получения высокого выхода рекомбинантных белков в клетках яичника китайского хомячка обычно используют вектор, содержащий промотор цитомегаловируса человека (cytomegalovirus CMV), который хотя и является сильным промотором, но склонен к транскрипционному молчанию, что приводит к снижению продуктивности клеток яичника китайского хомячка при их длительном культивировании [26]. Эти проблемы могут быть преодолены путем применения эпигенетической регуляции экспрессии генов, в частности за счет снижения уровня метилирования промотора цитомегаловируса человека. Метилирование ДНК катализируется ДНК-метилтрансферазами, запускающими Dnmt3a и Dnmt3b и поддерживающими метилирование Dnmt1. Применение технологии CRISPR/Cas9 позволило с высокой эффективностью провести геномное редактирование СНО-клеток и получить сайт-направленную модификацию гена *Dnmt3a*. В результате в *Dnmt3a*-дефицитной клеточной линии яичника китайского хомячка была зафиксирована стабильная и более длительная экспрессия трансгена под контролем промотора цитомегаловируса человека в течение более 60 пассажей [10].

Метаболическая инженерия клеток яичника китайского хомячка

Вначале генетические модификации для повышения уровня синтеза белков клетками-продуцентами прово-

Таблица. Геномное редактирование клеточных линий — продуцентов моноклональных антител

Геномное редактирование	Метод генетического редактирования	Целевые сайты генетического редактирования	Эффекты генетического редактирования	Линия клеток	Ссылка
Геномное редактирование, направленное на модификацию функциональной активности клеток-продуцентов МКА					
Нокаутирование гена <i>Dnmt3a</i>	CRISPR/Cas9	<i>Dnmt3a</i>	Улучшение стабильности экспрессии трансгена в рекомбинантных клетках CHO	CHO-K1	Jia и соавт., 2018 [10]
Встраивание гена, кодирующего синтез протеиндисульфидизомеразы (PDI)	Трансфекция	Ген <i>PDI</i>	Увеличение синтеза иммуноглобулинов	CHO2F5 MCB	Borth и соавт., 2005 [11]
Оверэкспрессия РНК-связывающего протеина холодового стресса	Трансфекция	Гены «холодового стресса»	Стабилизация транскриптов генов, участвующих в выживании клеток	CHO	Tap и соавт., 2008 [12]
Оверэкспрессия гена, кодирующего глутаминсинтазу (GS)	Трансфекция	Ген глутаминсинтазы (<i>GS</i>)	Возможность клеткам расти в среде без глутамина, что значительно снижает накопление аммония в среде	CHO, NS0	Zhang и соавт., 2016 [13]
Оверэкспрессия пируваткарбоксилазы	Трансфекция	Ген пируваткарбоксилазы	Снижение накопления молочной кислоты	CHO	Toussaint и соавт., 2016 [14]
Ингибирование лактатдегидрогеназы А (LDH-A)	Редактирование РНК с использованием малых интерферирующих РНК	Гены лактатдегидрогеназы и пируватдегидрогеназы	Снижение накопления молочной кислоты	CHO	Zhou и соавт., 2011 [15]
Увеличение длительности G1-фазы клеточных продуцентов	Трансфекция	Ген <i>p21^{cip1}</i>	Увеличение синтеза антител IgG4	NS0 6A1/4-9F	Iwata и соавт., 2003 [16]
Усиление экспрессии антиапоптотических генов	Трансфекция	<i>Mcl-1, Bcl-xL</i>	Увеличение уровня синтеза антител	-	Kunert и соавт., 2016 [17]
Интеграция гена сурвивин (<i>baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5, BIRC5</i>) — ингибитора апоптоза	CRISPR-Cas9, редактирование	<i>eGFP-HsQSOX1b</i> и <i>Survivin</i>	Увеличение жизнеспособности клеток-продуцентов в 6,40 раз и выхода конечного продукта — в 5,55 раз	CHO-K1	Wang и соавт., 2018 [6]
Увеличение экспрессии гена, кодирующего синтез протенидисульфидизомеразы, катализирующего формирование дисульфидных связей	Трансфекция	<i>BiP (HSPA5), циклофилин В (PPIB), и PDI (P4HB)</i>	Увеличение продукции МКА	CHO	Rybus и соавт., 2014 [18]
Гиперэкспрессия микро-РНК	Трансфекция	<i>cgr-miR-17, cgr-miR-221, cgr-miR-21</i> и <i>cgr-miR-210</i>	Усиление роста клеток и конечного выхода продукта	CHO	Jadhav и соавт., 2012 [19]
Гиперэкспрессия микро-РНК	Трансфекция	<i>Dicer, Drosha</i> and <i>Dgcr8</i>	Усиление пролиферации клеток	CHO	Nackl и соавт., 2014 [20]
Гиперэкспрессия микро-РНК	Трансфекция	<i>miR-466h-5p</i>	Модулирование устойчивости клеток к апоптозу	CHO	Druz и соавт., 2012 [21]
Геномное редактирование, направленное на модификацию МКА					
Нокаутирование гена, кодирующего фукозилтрансферазу	CRISPR/Cas9 редактирование	<i>FUT8</i>	Получение нефукозиллированных антител	CHO	Chung и соавт., 2012 [22]
Получение сайт-направленных инделов	CRISPR/Cas9 редактирование, биоинформатика	<i>COSMC, FUT8</i>	Получение нефукозиллированных антител	CHO	Ronda и соавт., 2014 [23]
Получение запрограммированных гликоформ IgG	CRISPR/Cas9 редактирование, белковая инженерия Fc области IgG	<i>ST3GAL4, ST3GAL6, FUT8</i>	Получение высокогалактиозилированных и афукозиллированных гликоформ IgG	CHO	Chung и соавт., 2017 [24]

Примечание. МКА — моноклональные антитела.

дили без учета метаболических путей. В 1990-х годах появилась новая технология, которая получила название «метаболическая инженерия». Метаболическая инженерия изучает в том числе специфические особенности метаболизма клеток и на основе этих данных помогает создать стратегию модификации клетки с направленными измененными метаболическими превращениями субстратов в целевые продукты.

Метаболизм клеток яичника китайского хомячка характеризуется высоким уровнем потребления глюкозы и глутамина, что приводит к накоплению лактата и аммиака соответственно как основных продуктов их метаболизма. Накопление лактата и аммиака в клеточных культуральных средах приводит к изменению pH и осмолярности, что ингибирует рост и продуктивность клеточной культуры яичника китайского хомячка.

В связи с этим прежде всего необходимо контролировать содержание лактата в среде, не снижая при этом концентрацию клеточной культуры. С этой целью модифицировали технологический процесс культивирования клеток, включая замену питательных веществ: например, глюкозу — галактозой или пируватом, глутамин — аспарагином или глутаматом [11]. Обычно замена питательных веществ позволяла уменьшить накопление продуктов распада в среде, однако при этом наблюдалось замедление роста клеток-продуцентов и за счет этого снижение выхода конечного продукта. Применение методов метаболической инженерии позволяет изменить активность ферментов, участвующих в метаболическом пути, и в результате снизить накопление токсических веществ.

При снижении температуры культивирования способность клеток яичника китайского хомячка синтезировать белки повышается, что обусловлено замедлением их роста, увеличением времени их жизни и увеличением их размеров. При низкотемпературном стрессе изменяется экспрессия генов и запускается синтез новых белков: например, происходит гиперэкспрессия РНК-связывающего протеина холодового стресса. Стабильная гиперэкспрессия РНК-связывающего протеина холодового стресса способствует увеличению синтеза целевого продукта клетками CHO [12]. Индуцируемый холодом микроРНК-связывающий белок выполняет защитную роль в реакции генотоксического стресса за счет стабилизации транскриптов генов, участвующих в выживании клеток, активации процесса трансляции, а также имеет существенное значение в подавлении пролиферации клеток. Таким образом, это одна из технологий метаболической генной инженерии, которая направлена на увеличение экспрессии подобных стрессовых белков.

Другой подход метаболической инженерии клеток яичника китайского хомячка направлен на снижение уровня продуктов метаболизма, которые в конечном итоге приводят к снижению синтеза продукта. Например, гиперэкспрессия гена, кодирующего глутамин синтетазу (GS) в клетках яичника китайского хомячка, дает возможность клеткам расти в среде без глутамина, что значительно снижает накопление аммония в среде [13]. Гиперэкспрессия некоторых ферментов азотного цикла может способствовать снижению накопления продуктов аммония в культуральной среде. Генетические модификации, направленные на снижение накопления молочной кислоты за счет гиперэкспрессии пируваткарбоксилазы [14] или ингибирования лактатдегидрогеназы А (LDH-A) [15], также позволяют увеличить выход конечного продукта в клеточной культуре яичника китайского хомячка.

Регулирование клеточного цикла

Одним из подходов повышения продукции антител клетками яичника китайского хомячка является увеличение длительности клеточного цикла в G0/G1-фазе. N. Iwaga и соавт. (2003) [16] показали увеличение длительности G1-фазы миеломной клеточной линии NS0 6A1/4–9F при индуцибельной экспрессии p21^{cip1}, что приводило к увеличению синтеза антител IgG4. Для индукции экспрессии факторов, регулирующих клеточный цикл (p27^{KIP1} и p21^{cip1}), также предлагалось использовать рапамицин, который снижает скорость смены клеточного цикла клетками. Остановка в фазе G0/G1 клеточного цикла была достигнута также при ингибировании циклинзависимой киназы или гиперэкспрессии ее ингибитора. Благодаря селективному ингибированию циклин CDK 4/6 отмечалось увеличение синтеза специфического продукта в 2–3 раза [27].

Регуляция апоптоза

При стрессовых ситуациях, вызванных изменением pH, недостатком питательных веществ, высокой плотностью клеточной культуры и т.п., запускаются реакции апоптоза, приводящие к гибели клетки. Блокирование реакции запуска апоптоза способствует увеличению времени культивирования клеток и, соответственно, повышению продуктивности клеточной культуры. Существует несколько подходов для увеличения продолжительности жизни клеток, включая увеличение экспрессии антиапоптотических сигналов и делецию проапоптотических генов.

За счет усиления экспрессии антиапоптотических генов (*Mcl-1*, *30Kс6*, *Bcl-2*, *Bcl-w*, *Bcl-xL*, *Aven*, *E1B-19K*) и супрессии проапоптотических генов (*Bax*, *Bok*, *Bak*) в клетках млекопитающих отмечалось увеличение уровня синтеза белков, в том числе антител [17]. После трансфекции гена *Bcl-xL* продуктивность клеток яичника китайского хомячка возрастала на 82 %, а после трансфекции гена *Mcl-1* — на 34 % [28]. Снижение апоптоза в клеточной культуре удалось достигнуть за счет ингибирования каспаз, запускающих реакции апоптоза [17].

С использованием технологии CRISPR-Cas9 для повышения производительности биосинтеза целевого продукта в клетки CHO-K1 был интегрирован ген сурвивин, или, как его еще называют, *BIRC5* (*baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5*), являющийся ингибитором апоптоза. В результате жизнеспособность отредактированных клеток CHO-K1 была увеличена в 6,40 раз, а выход конечного продукта — в 5,55 раз [6].

Специфические микро-РНК: посттрансляционные модификации

Трансляция

Регуляция синтеза белков на стадии трансляции более энергозатратна, чем регуляция на уровне транскрипции, но способна быстро реагировать на изменения потребности клетки в белках. Регуляция трансляции белка осуществляется через регуляцию ее инициации тремя основными способами:

- 1) позитивной регуляцией синтеза за счет средства микроРНК к рибосомам и факторам инициации трансляции;
- 2) трансляционной репрессией на основании негативной регуляции с помощью белков или микро-РНК, находящихся в составе белковых комплексов;

3) тотальной регуляцией трансляции всей совокупности микроРНК клетки, происходящей при изменении активности факторов инициации трансляции (например, через инактивацию фактора eIF2).

Было выявлено, что у эффективных продуцентов рекомбинантных белков — клеток линии яичника китайского хомячка — уровни микроРНК рекомбинантного продукта в клетке не коррелируют с количеством секретируемого белка. Это позволило предположить важность роли трансляционных и/или посттрансляционных событий в клетке [29].

МикроРНК. Одним из подходов метаболической инженерии для увеличения выхода рекомбинантного белка клетками яичника китайского хомячка является сверхэкспрессия специфических микроРНК. МикроРНК являются эволюционно консервативными малыми некодирующими РНК (нРНК), которые посттранскрипционно модулируют экспрессию генов в эукариотических клетках. Они функционируют как молекулы немедленного ответа на внешние стимулы, и отдельные микроРНК могут одновременно регулировать множество различных генов путем несовершенного связывания со специфическими сайтами-мишенями на РНК-мессенджере [29].

Некодирующие РНК дают возможность регулировать целые сигнальные сети, потому что одна микроРНК может посттранскрипционно подавлять экспрессию до ста различных мишеней микроРНК [30, 31]. В последние годы был описан еще один класс малых РНК — так называемые неканонические микроРНК (нкРНК), которые, по некоторым данным [32, 33], функционируют подобно микроРНК. Эти РНК могут быть получены из некодирующих РНК «домашнего хозяйства», включая рибосомную РНК (рРНК) или транспортную РНК (тРНК). Интересно, что неканонические микроРНК могут также происходить из митохондриальных нкРНК млекопитающих и называются кодированными митохондриальными геномами малыми РНК (митохРНК) [34, 35].

Часто для увеличения продукции различных рекомбинантных белков в системе экспрессии млекопитающих применяют двухфазное культивирование со снижением температуры в конце фазы экспоненциального роста клеточной культуры. Анализ транскриптома позволил выявить изменения профиля микроРНК при различных условиях температуры культивирования, системы культивирования и культуральных сред [36] для разных линий клеток яичника китайского хомячка, характеризующихся разными темпами роста и уровнями продуктивности [37, 38]. Была показана корреляция между отдельными транскриптами микроРНК и уровнем пролиферации клеток [39] или стрессовой реакцией клетки [21]. Выявлена важность регуляции созревания микроРНК на разных стадиях пролиферации клеток яичника китайского хомячка. В цитоплазме премикроРНК разрезается ферментом Dicer, содержащим каталитический центр РНКазы III. Уровни микроРНК и белка Dicer положительно коррелируют со скоростью роста клетки во время экспоненциальной фазы. Переход в стационарную фазу клеточного роста сопровождается подавлением активности Dicer [20]. В работах ряда исследователей показано, что микроРНК можно использовать для улучшения роста клеток яичника китайского хомячка [19], модулирования их устойчивости к апоптозу [21] и специфической продуктивности [19].

Транскриптом клеток яичника китайского хомячка включает сотни микроРНК. Для скрининга микроРНК и выявления влияния их сверхэкспрессии на повыше-

ние продуктивности клеток яичника китайского хомячка был предложен подход, включающий клонирование микроРНК в небольшие шпилечные векторы, включая кассету GFP, и их трансфекцию с дальнейшим анализом роста клеток СНО в течение 4 дней. Выбор функционально значимых микроРНК проводится на основании сравнительного анализа фенотипа клеток яичника китайского хомячка, включающего рост, жизнеспособность и продуктивность. На основании данного подхода в качестве потенциального кандидата для сверхэкспрессии в клетках яичника китайского хомячка был выбран miR-17 [19].

МикроРНК Mmu-miR-466h-5p играет проапоптотическую роль в клетках яичника китайского хомячка за счет снижения экспрессии нескольких антиапоптотических генов. Стабильное ингибирование mmu-miR-466h-5p в сконструированной линии клеток яичника китайского хомячка приводило к поздней активации каспазы-3/7 (более чем на 35 ч), культивируемой в условиях инициации апоптоза, а также повышению уровней антиапоптотических генов-мишеней (smo, stat5a, dad1, birc6 и bcl2l2) в 2,1–12,5 раза по сравнению с отрицательным контролем клеток яичника китайского хомячка. Специфическая продуктивность клеток яичника китайского хомячка со сверхэкспрессией mmu-miR-466h-5p увеличилась на 11 % [21].

Клетки яичника китайского хомячка, стабильно экспрессирующие микро-РНК miR-17, демонстрировали как улучшенные характеристики роста, так и удвоенную удельную продуктивность [19].

Длинные некодирующие РНК (нРНК-lncRNAs) представляют собой транскрипты длиной более 200 нуклеотидов, которые лишены значительной открытой рамки считывания (ORF). Обычно нРНК транскрибируются РНК-полимеразой II и сплайсируются с полиаденилированием или без него. Ряд молекул нРНК играет ключевые регуляторные роли в различных биологических процессах, включая эпигенетическую регуляцию [40], контроль транскрипции, [41], сплайсинга [42] и трансляцию микроРНК [43]. нРНК способны модулировать широкий спектр клеточных процессов и механизмов как в ядре, так и в цитоплазме [44]. В клетке нРНК выступают в качестве конкурирующих эндогенных РНК (competing endogenous, ceRNAs), связываясь и изолируя микроРНК [45], действуя как архитектурные РНК (arcRNAs), посредством чего они образуют функциональные структуры [46], повышающие экспрессию генов, или в виде трансбелковых связывающих молекул РНК, которые могут рекрутировать хроматин-модификатор [47]. нРНК могут выступать в качестве предшественников микроРНК, модуляторов стабильности микроРНК, и влиять на посттрансляционные модификации [48].

Несмотря на важность нРНК в контроле клеточных процессов, лишь в последние два-три года появились исследования, показывающие влияние экспрессии нРНК на эффективность синтеза рекомбинантного белка клетками яичника китайского хомячка [49, 50]. Одной из причин небольшого количества исследований нРНК в клетках яичника китайского хомячка является отсутствие данных об их некодирующих транскриптах. Это затрудняет идентификацию целевых нРНК для клеточной инженерии. Решением этой проблемы может стать сходство между геномом китайского хомяка и мыши [51, 52], для клеток которой количество известных некодирующих транскриптов намного выше. В частности, такой подход использовался для идентификации 416 нРНК на основе секвенированных транскриптов из объединенного об-

разца клеток яичника китайского хомячка в сравнении с базой данных fRNAdb некодирующих РНК с использованием BLAST [51]. В 2018 г. вышла работа D. Vito с соавт. [48], которые проанализировали и сравнили между собой кодирующие и некодирующие транскрипты клеток яичника китайского хомячка, культивируемых при различных условиях и в разные периоды их жизнедеятельности. На основании проведенного анализа были идентифицированы потенциальные мишени нРНК в клетках яичника китайского хомячка для дальнейших манипуляций с целью увеличения их пролиферативной активности и жизнеспособности [48].

Геномное редактирование, направленное на модификацию моноклональных антител, синтезируемых клетками-продуцентами

Инженерия шаперонов

Ключевую роль в фолдинге МКА, синтезируемых в клеточных линиях, играют шапероны, поэтому одним из подходов, направленных на увеличение синтеза рекомбинантных белков СНО-клетками, заключается в регуляции функциональной активности шаперонов. Например, увеличение экспрессии гена, кодирующего синтез протеиндисульфидизомеразы (PID), фермента, катализирующего формирование дисульфидных связей, усиливало синтез МКА клетками яичника китайского хомячка [18]. При модификации активности шаперонов важно выбрать правильную мишень: в частности, усиление экспрессии связывающего протеина, способствующего фолдированию секретируемых белков, отдельно или совместно с оверэкспрессией дисульфидизомеразы, снижало эффективность синтеза МКА клетками яичника китайского хомячка [18].

Гликозилирование антител

Иммуноглобулины человека относятся к гликопротеинам. Как все гликопротеины, иммуноглобулины подвергаются гликозилированию в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи. N-гликановая структура антител играет ключевую роль в проявлении их биологической активности. Общий механизм терапевтических антител связан с проявлением антителзависимой клеточной цитотоксичности и комплементзависимой цитотоксичности. Любые изменения N-гликановой структуры антител могут ингибировать механизмы действия антител.

Степень гликозилирования зависит от класса иммуноглобулина. Минимальное количество гликанов содержится в иммуноглобулинах класса G (около 3 %), больше — в IgA (около 7,5 %), больше всего — в IgD, IgM, IgE (12 %). N-связанные гликаны содержатся в Fc- и в Fab-фрагментах иммуноглобулинов; O-гликаны обнаружены только в шарнирной области IgD, IgA и IgG3 [53].

Несмотря на использование в качестве системы экспрессии для производства терапевтических моноклональных антител клеток млекопитающих (клетки яичника китайского хомячка или Sp/0), в которых также происходит гликозилирование белков, выявлена разница в особенностях гликозилирования антител человека и рекомбинантных иммуноглобулинов человека. Это обусловлено существующими отличиями между внутриклеточными факторами гликозилирования, включая нуклеотидные производные сахаров, гликозидаз, синтетаз и гликозилтрансфераз, а также различиями в пуле белков-транспортеров нуклеотидных производных сахаров.

Фукозилирование антител

Клетки яичника китайского хомячка характеризуются низким уровнем разрезания N-ацетилглюкозамина и высоким уровнем корового фукозилирования. Оверэкспрессия N-ацетилглюкозаминил трансферазы III (GnT-III) способствует увеличению активности разрезания N-ацетилглюкозамина, что приводит к повышению антителзависимой клеточной цитотоксичности [54]. Снижение или элиминация фукозы в моноклональных антителах также способствует увеличению антителзависимой клеточной цитотоксичности. Нокаутирование гена, кодирующего фукозилтрансферазу (FUT 8) в клетках яичника китайского хомячка, приводит к получению нефукозилированных антител [22]. Применение технологии CRISPR/Cas9 позволило получить инделлы с частотой от 13,6 до 47,3 % в пуле трансфицированных клеток с эффективностью трансфекции приблизительно 60 % [23]. Для сравнения, частота генетических нарушений в клетках яичника китайского хомячка с использованием «цинковых пальцев» составила 3,8 и 6,3 % для *Bak* и *Vax* соответственно [55].

Галактозилирование

Концевая галактоза Asn297 гликана принимает участие в связывании Fc-фрагмента с FcγR3A. Гликан в Asn297 каждого константного домена тяжелой цепи IgG играет критическую роль во взаимодействии антитела с Fc-рецептором. Структура гликана в Fc-фрагменте антитела влияет на индукцию антителозависимой клеточной цитотоксичности.

Для редактирования клеток яичника китайского хомячка с целью получения высокоэффективных терапевтических антител была предложена платформа, объединяющая геномную и белковую инженерию. Для получения гипергалактозилированной гликоформы IgG в клетках яичника китайского хомячка применялось комбинированное редактирование с использованием системы CRISPR/Cas и методов белковой инженерии (модуляция Fc-фрагмента IgG за счет мутаций аминокислотных остатков). В результате были получены антитела, содержащие высокогалактозилированные и афуколизированные гликоформы [24].

Сиалирование

Это присоединение сиаловой кислоты к гликанам. Для клеток яичника китайского хомячка характерен повышенный уровень сиалирования гликопротеинов (около 31 %) по сравнению с гликопротеинами человека: уровень сиалирования IgG1 плазмы крови здорового человека составляет от 2 до 5 % [56]. Сравнительные исследования показали, что в клетках человека синтезируется как α2,3-, так и α2,6-сиалилтрансфераза, а в клетках яичника китайского хомячка α2,6-сиалилтрансфераза не образуется. Следовательно, терминальное сиалирование в клетках яичника китайского хомячка происходит исключительно через α2,3-связь. В результате синтезированные IgG в клетках яичника китайского хомячка характеризуются снижением аффинитета Fc-фрагмента.

Антитела с усиленным сиалированием α-2,6 характеризуются повышенной антителозависимой клеточной цитотоксичностью. Более того, при внутривенном введении иммуноглобулина, сиалированного по гликану, в Fc-части отмечается усиление его противовоспалительных свойств [57].

Получение антител с α-2,6 сиалированием в системе яичника китайского хомячка является сложной зада-

чей из-за недоступности сиалилтрансферазы для сайта N-гликана тяжелой цепи и присутствия исключительно α -2,3 сиалилтрансфераз. Для выполнения этой задачи вначале с использованием CRISPR/Cas9 были удалены гены *ST3GAL4* и *ST3GAL6* для минимизации сиалирования α -2,3, а затем получены клетки яичника китайского хомячка, сверхэкспрессирующие α -2,6-сиалилтрансферазу, что позволило получить IgG с повышенным уровнем α -2,6-сиалирования [24].

Иммуногенность

В отличие от нативных человеческих антител, IgG, являющиеся продуктом клеток яичника китайского хомячка, содержат чужеродные для человека галактоза- α 1,3-галактозу (α -Gal) и N-гликолилнейраминовую кислоту (Neu5Gc), расположенные в терминальной части гликана. Подобные иммуноглобулины являются иммуногенными для человека. Для снижения иммуногенности синтезируемых МКА гены, кодирующие синтез α -Gal и Neu5Gc, нокаутируют или модифицируют.

Проблемы стабилизации препаратов моноклональных антител

Терапия моноклональными антителами подразумевает инъекции в небольших объемах, но с высокой концентрацией антител, иногда превышающих 100 мг/мл. Это приводит к значительным проблемам, связанным с сохранением стабильности препарата, образованием обратимых нековалентных белковых агрегатов, что приводит к повышенной вязкости препарата. Для стабилизации препаратов с высокой концентрацией моноклональных антител добавляют вспомогательные вещества, например сахара. Однако чрезмерное использование эксципиентов может приводить к токсичности высококонцентрированных составов моноклональных антител.

Терапевтическая эффективность моноклональных антител тесно связана с их структурной, конформационной и химической стабильностью. Наиболее распространенные причины физической нестабильности возникают при нарушении температурного режима хранения, механических нагрузках. Химическая деградация, включающая дезамидирование, окисление, изомеризацию, гидролиз пептидной связи, фрагментацию и сшивание, также влияет на первичную последовательность моноклональных антител, что может привести к значительным изменениям в их структуре и, соответственно, потере функции.

Для стабилизации моноклональных антител оптимизируют кислотность препаратов, используя эффективные буферные компоненты, поверхностно-активные веще-

ства, а также сахара и полиолы, выполняющие антиоксидантные, хелаторные и/или криопротекторные функции.

Заключение

Применение препаратов на основе моноклональных антител является одной из наиболее активно развивающихся областей в современной терапии онкологических, вирусных, бактериальных и аутоиммунных заболеваний. Это обусловлено высокой специфичностью терапевтических моноклональных антител, которые обеспечивают адресную направленность эффектов. Но даже несмотря на внедрение технологий, позволяющих получать полностью человеческие моноклональные антитела, все еще остаются проблемы, обусловленные возможным проявлением иммуногенности препаратов. Приведенные в статье данные свидетельствуют о том, что большое влияние на иммуногенность препарата оказывают особенности процессов посттрансляционной модификации моноклональных антител в клетках-продуцентах. На примере клеточной линии яичника китайского хомячка, наиболее часто используемой для получения терапевтических моноклональных антител, было показано, что использование современных инструментов и подходов к геномному редактированию клеток-продуцентов позволяет повысить уровень и стабильность синтеза моноклональных антител, а также снизить их иммуногенность. Эффективность модификации клеток-продуцентов увеличивается при разработке стратегии их редактирования с учетом данных метаболической инженерии, а также благодаря применению и развитию современных инструментов генетического редактирования CRISPR/Cas9.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках Соглашения № 075-15-2019-1671 от 31 октября 2019 г. с Минобрнауки России (задача 2.8 Разработка рекомбинантных человеческих моноклональных антител для лечения заболеваний, вызванных патогенными микроорганизмами, бактериальными и растительными токсинами).

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grilo AL, Mantalaris A. The increasingly human and profitable monoclonal antibody market. *Sci Soc.* 2019;37(1):9–16. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.05.014.
2. Jefferis R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(3):226–234. doi: 10.1038/nrd2804.
3. Puck TT. *Development of the Chinese Hamster Ovary (CHO) cell for use in somatic cell genetics.* In: Gottesman M.M., ed. *Molecular cell genetics.* John Wiley and Sons: New York, NY, USA; 1985. P. 37–64.
4. Eigen M, Schuster P. The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle. *Naturwissenschaften.* 1977;64(11):541–565. doi: 10.1007/bf00450633.
5. Wurm FM, Wurm MJ. Cloning of CHO cells, productivity and genetic stability — a discussion. *Processes.* 2017;5(20):1–13. doi: 10.3390/pr5020020.
6. Wang W, Zheng W, Hu F, et al. Enhanced biosynthesis performance of heterologous proteins in CHO-K1 cells using CRISPR-Cas9. *ACS Synth Biol.* 2018;7(5):1259–1268. doi: 10.1021/acssynbio.7b00375.
7. Lieu PT, Machleidt T, Thyagarajan B, et al. Generation of site-specific retargeting platform cell lines for drug discovery using phiC31 and R4 integrases. *J Biomol Screen.* 2009;14(10):1207–1215. doi: 10.1177/1087057109348941.
8. Kito M, Itami S, Fukano Y, et al. Construction of engineered CHO strains for high-level production of recombinant proteins. *Appl*

- Microbiol Biotechnol.* 2002;60(4):442–448. doi: 10.1007/s00253-002-1134-1.
9. Huang Y, Li Y, Wang YG, et al. An efficient and targeted gene integration system for high-level antibody expression. *J Immunol Methods.* 2007;322(1–2):28–39. doi: 10.1016/j.jim.2007.01.022
 10. Jia YL, Guo X, Lu JT, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout for DNA methyltransferase Dnmt3a in CHO cells displays enhanced transgenic expression and long-term stability. *J Cell Mol Med.* 2018;22(9):4106–4116. doi: 10.1111/jcmm.13687.
 11. Borth N, Mattanovich D, Kunert R, Katinger H. Effect of increased expression of protein disulfide isomerase and heavy chain binding protein on antibody secretion in a recombinant CHO cell line. *Biotechnol Prog.* 2005;21(1):106–111. doi: 10.1021/bp0498241.
 12. Tan HK, Lee MM, Yap MG, Wang DI. Overexpression of cold-inducible RNA-binding protein increases interferon-gamma production in Chinese-hamster ovary cells. *Biotechnol Appl Biochem.* 2008;49(4):247–257. doi: 10.1042/BA20070032.
 13. Zhang P, Woen S, Wang T, et al. Challenges of glycosylation analysis and control: an integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs. *Drug Discov. Today.* 2016;21:740–765. doi: 10.1016/j.drudis.2016.01.006.
 14. Toussaint C, Henry O, Durocher Y. Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures. *J Biotechnol.* 2016;217:122–131. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.11.010.
 15. Zhou M, Crawford Y, Ng D, et al. Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases. *J Biotechnol.* 2011;153(1–2):27–34. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.03.003.
 16. Ibarra N, Watanabe S, Bi JX, et al. Modulation of cell cycle for enhancement of antibody productivity in perfusion culture of NS0 cells. *Biotechnol Prog.* 2003;19(1):224–228. doi: 10.1021/bp025589f.
 17. Kunert R, Reinhart D. Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100:3451–3461. doi: 10.1007/s00253-016-7388-9.
 18. Pybus LP, Dean G, West NR, et al. Model-directed engineering of “difficult-to-express” monoclonal antibody production by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng.* 2014;111(2):372–385. doi: 10.1002/bit.25116.
 19. Jadhav V, Hackl M, Bort JA, et al. A screening method to assess biological effects of microRNA overexpression in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng.* 2012;109(6):1376–1385. doi: 10.1002/bit.24490.
 20. Hackl M, Jadhav V, Klanert G, et al. Analysis of microRNA transcription and post-transcriptional processing by Dicer in the context of CHO cell proliferation. *J Biotechnol.* 2014;190:76–84. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.12.018.
 21. Druz A, Betenbaugh M, Shiloach J. Glucose depletion activates mmu-miR-466h-5p expression through oxidative stress and inhibition of histone deacetylation. *Nucleic Acids Research.* 2012;40(15):7291–7302. doi: 10.1093/nar/gks452.
 22. Chung S, Quarmby V, Gao X, et al. Quantitative evaluation of fucose reducing effects in a humanized antibody on Fcγ receptor binding and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activities. *MAbs.* 2012;4(3):326–340. doi: 10.4161/mabs.19941.
 23. Ronda C, Pedersen LE, Hansen HG, et al. Accelerating genome editing in CHO cells using CRISPR Cas9 and CRISPy, a web-based target finding tool. *Biotechnol Bioeng.* 2014;111(8):1604–1616. doi: 10.1002/bit.25233.
 24. Chung CY, Wang Q, Yang S, et al. Combinatorial genome and protein engineering yields monoclonal antibodies with hypergalactosylation from CHO cells. *Biotechnol Bioeng.* 2017;114(12):2848–2856. doi: 10.1002/bit.26375.
 25. Chusainow J, Yang YS, Yeo JH, et al. A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: what makes a stable high producer? *Biotechnol Bioeng.* 2009;102(4):1182–1196. doi: 10.1002/bit.22158.
 26. Osterlechner A, Simmeth S, Göpfert U. Promoter methylation and transgene copy numbers predict unstable protein production in recombinant Chinese hamster ovary cell lines. *Biotechnol Bioeng.* 2011;108(11):2670–2681. doi: 10.1002/bit.23216.
 27. Du Z, Treiber D, McCarter JD, et al. Use of a small molecule cell cycle inhibitor to control cell growth and improve specific productivity and product quality of recombinant proteins in CHO cell cultures. *Biotechnol Bioeng.* 2015;112(1):141–155. doi: 10.1002/bit.25332.
 28. Zhang X, Han L, Zong H, et al. Enhanced production of anti-PD1 antibody in CHO cells through transient co-transfection with anti-apoptotic genes Bcl-x L and Mcl-1. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2018;41(5):633–640. doi: 10.1007/s00449-018-1898-z.
 29. Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: Recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet.* 2012;13(4):271–282. doi: 10.1038/nrg3162.
 30. Barron N, Sanchez N, Kelly P, Clynes M. MicroRNAs: tiny targets for engineering CHO cell phenotypes? *Biotechnol Lett.* 2011;33(1):11–21. doi: 10.1007/s10529-010-0415-5.
 31. Hack M, Borth N, Grillari J. MiRNAs — pathway engineering of CHO cell factories that avoids translational burdening. *Trends Biotechnol.* 2012;30:405–406. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.05.002.
 32. Burroughs AM, Ando Y, de Hoon MJ, et al. Deep-sequencing of human Argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals Argonaute association with RNA fragments of diverse origin. *RNA Biol.* 2011;8(1):158–177. doi: 10.4161/rna.8.1.14300.
 33. Keam SP, Hutvagner G. tRNA-derived fragments (tRFs): emerging new roles for an ancient RNA in the regulation of gene expression. *Life.* 2015;5(4):1638–1651. doi: 10.3390/life5041638.
 34. Dietrich A, Wallet C, Iqbal RK, et al. Organellar non-coding RNAs: emerging regulation mechanisms. *Biochimie.* 2015;117:48–62. doi: 10.1016/j.biochi.2015.06.027.
 35. Ro S, Ma HY, Park C, et al. The mitochondrial genome encodes abundant small noncoding RNAs. *Cell Res.* 2011;23(6):759–774. doi: 10.1038/cr.2013.37.
 36. Stiefel F, Fischer S, Sczyrba A, et al. miRNA profiling of high, low and non-producing CHO cells during biphasic fed-batch cultivation reveals process relevant targets for host cell engineering. *J Biotechnol.* 2016;225:31–43. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.03.028.
 37. Klanert G, Jadhav V, Shanmukam V, et al. A signature of 12 microRNAs is robustly associated with growth rate in a variety of CHO cell lines. *J Biotechnol.* 2016;235:150–161. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.03.022
 38. Lim SM, Park SH, Lee JH, et al. Differential expression of microRNAs in recombinant Chinese hamster ovary cells treated with sodium butyrate using digital RNA counting. *J Biotechnol.* 2018;283:37–42. doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.07.018.
 39. Bort JA, Hackl M, Hoflmayer H, et al. Dynamic mRNA and miRNA profiling of CHO-K1 suspension cell cultures. *J Biotechnol.* 2012;7(4):500–515. doi: 10.1002/biot.201100143.
 40. Betancur JG. Pervasive lncRNA binding by epigenetic modifying complexes: the challenges ahead. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1859(1):93–101. doi: 10.1016/j.bbagr.2015.10.009.
 41. Trimarchi T, Bilal E, Ntziachristos P, et al. Genome-wide mapping and characterization of Notch-regulated long noncoding RNAs in acute leukemia. *Cell.* 2014;158(3):593–606. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.049.
 42. Gonzalez I, Munita R, Agirre E, et al. A lncRNA regulates alternative splicing via establishment of a splicing-specific chromatin signature. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;22(5):370–376. doi: 10.1038/nsmb.3005.
 43. Loayza-Puch F, Agamia R. Lncing protein translation to metastasis. *EMBO J.* 2013;32(20):2657–2658. doi: 10.1038/emboj.2013.210.

44. Geisler S, Collier J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(11):699–712. doi: 10.1038/nrm3679.
45. Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. *Nature.* 2014;505(7483):344–352. doi: 10.1038/nature12986.
46. Chujo T, Yamazaki T, Hirose T. Architectural RNAs (arcRNAs): a class of long noncoding RNAs that function as the scaffold of nuclear bodies. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1859(1):139–146. doi: 10.1016/j.bbarm.2015.05.007.
47. Gomez JA, Wapinski OL, Yang YW, et al. The NeST long ncRNA controls microbial susceptibility and epigenetic activation of the interferon- γ locus. *Cell.* 2013;152(4):743–754. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.015.
48. Vito D, Smales CM. The long non-coding RNA transcriptome landscape in CHO cells under batch and fed-batch conditions. *Biotechnol J.* 2018;13(10):e1800122. doi: 10.1002/biot.201800122.
49. Patrucco L, Chiesa A, Soluri MF, et al. Engineering mammalian cell factories with SINEUP noncoding RNAs to improve translation of secreted proteins. *Gene.* 2015;569(2):287–293. doi: 10.1016/j.gene.2015.05.070.
50. Zucchelli S, Patrucco L, Persichetti F, et al. Engineering translation in mammalian cell factories to increase protein yield: the unexpected use of long non-coding SINEUP RNAs. *Comput Struct Biotechnol J.* 2016;14:404–410. doi: 10.1016/j.csbj.2016.10.004.
51. Xu X, Nagarajan H, Lewis NE, et al. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nat Biotechnol.* 2011;29(8):735–741. doi: 10.1038/nbt.1932.
52. Becker J, Hackl M, Rupp O, et al. Unraveling the Chinese hamster ovary cell line transcriptome by next-generation sequencing. *J Biotechnol.* 2011;156(3):227–235. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.09.014.
53. Plomp R, Dekkers G, Rombouts Y, et al. Hinge region O-glycosylation of human immunoglobulin G3 (IgG3). *Mol Cell Proteomics.* 2015;14(5):1373–1384. doi: 10.1074/mcp.M114.047381.
54. Popp O, Moser S, Zielonka J, et al. Development of a pre-glycoengineered CHO-K1 host cell line for the expression of antibodies with enhanced Fc mediated effector function. *MAbs.* 2018;10(2):290–303. doi: 10.1080/19420862.2017.1405203.
55. Grav LM, Lee JS, Gerling S, et al. One-step generation of triple knockout CHO cell lines using CRISPR/Cas9 and fluorescent enrichment. *Biotechnol J.* 2015;10(9):1446–1456. doi: 10.1002/biot.201500027.
56. Mimura Y, Kelly RM, Unwin L, et al. Enhanced sialylation of a human chimeric IgG1 variant produced in human and rodent cell lines. *J Immunol Methods.* 2016;428:30–36. doi: 10.1016/j.jim.2015.11.009.
57. Kurogochi M, Mori M, Osumi K, et al. Glycoengineered monoclonal antibodies with homogeneous glycan (M3, G0, G2, and A2) using a chemoenzymatic approach have different affinities for Fc-gamma RIIa and variable antibody-dependent cellular cytotoxicity activities. *PLoS one.* 2015;10:e0132848. doi: 10.1371/journal.pone.0132848.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

*Фирстова Виктория Валерьевна, д.б.н. [Victoria V. Firstova, PhD];

адрес: 142279, Московская область, п. Оболенск; тел.: +7 (496) 731-19-15, e-mail: firstova@obolensk.org,

SPIN-код: 9166-9151, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9898-9894>

Шемякин Игорь Георгиевич, д.м.н., профессор [Igor G. Shemyakin, PhD, Professor];

e-mail: shemyakin@obolensk.org, SPIN-код: 3180-1459, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9667-1674>

Дятлов Иван Алексеевич, д.м.н., профессор, академик РАН [Ivan A. Dyatlov, MD, PhD, Professor];

e-mail: Dyatlov@obolensk.org, SPIN-код: 6567-8380, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1078-4585>