

Получение универсальной клеточной линии НЕК293 со встроенными сайтами FRT для последующего создания линий продуцентов целевых белков

Шаталина В.А. (ИТМО)

Научный руководитель – кандидат биологических наук, доцент Радько С.В. (ИТМО)

Введение. В последние годы мировой фармацевтический рынок переживает значительный рост. Объём российской доли рынка в 2022-м году достиг 2,5 млрд рублей, из которых 18,3% пришлось на биотехнологические препараты [1]. В 2023-2024 годах наблюдалось некоторое снижение ввиду стабилизации после резкого роста в период пандемии COVID-19, при этом сохранялись и положительные тенденции, такие как включение биотехнологического сектора в перечень приоритетных направлений научно-технического развития в 2024 году [2].

Основной платформой для получения биотехнологических лекарственных препаратов являются клеточные линии-продуценты терапевтических рекомбинантных белков. Получение и совершенствование таких клеточных линий является сложным технологическим процессом, оптимизация которого является актуальной задачей.

Основная часть. В рамках данной работы описано получение клеточной линии НЕК293 с интегрированным в геном FRT-сайтами, по которым в дальнейшем может быть проведена сайт-специфичная встройка целевой экспрессионной кассеты, несущей ген терапевтического белка.

Работа была разделена на 2 этапа: интеграция FRT-сайтов в геном на первом этапе и проверка эффективности встройки целевой экспрессионной кассеты с флуоресцентным белком по этим сайтам на втором этапе работы. Встройка FRT-сайтов в геном осуществлялась с помощью SpCas9 по механизму гомологичной рекомбинации.

В рамках 1-го этапа рестрикционно-лигазным способом была получена донорная плазмида, содержащая кассету с FRT-сайтами, геном устойчивости к селективному антибиотику и плечами гомологии к участку генома, в который проводилась направленная встройка. Встройка проводилась с использованием эндонуклеазы SpCas9, закодированной в отдельной плазмиде. Далее путём двуплазмидной трансфекции с использованием липофектамина, плазмиды были введены в адгезионную культуру клеток НЕК293. После элиминации транзientной экспрессии плазмиды клетки были моноклонированы в 96-ти луночные планшеты и переведены на среду, содержащую селективный антибиотик, соответствующий гену устойчивости в донорной плазмиде. Моноклон определялся, как содержащий встройку, при детекции методом микроскопии роста и пролиферации трансфецированных клеток в среде с антибиотиком при одновременной гибели контрольных клеток НЕК293 дикого типа в этой среде.

На 2-м этапе работы для проверки эффективности встройки по интегрированным FRT-сайтам рестрикционно-лигазным способом была получена вторая плазмида, содержащая экспрессионную кассету с геном синего флуоресцентного белка, фланкированным FRT-сайтами, аналогичными используемым в донорной плазмиде. Отобранные на предыдущем этапе моноклоны прошли повторную двуплазмидную трансфекцию: с плазмидой, несущей ген флуоресцентного белка, фланкированного FRT-сайтами, и плазмидой, содержащей ген флиппазы (Flp), который распознаёт FRT-сайты и осуществляет рекомбинацию по ним. Полученная популяция каждого из трансфецированных моноклонов прошла обогащение на клеточном сортере по уровню флуоресценции, наблюдаемой в синем диапазоне.

Далее, в ходе исследования, планируется отбор моноклонов с наиболее интенсивной флуоресценцией и дополнительный анализ копийности встройки путём метода ПЦР в реальном времени.

Выводы. Эксперименты по интеграции направленной встройки FRT-сайтов показали достаточную эффективность в клетках НЕК293, в результате которых получены моноклоны с интегрированными в геном FRT-сайтами. Дополнительные эксперименты по проверке эффективности встройки целевой кассеты по FRT-сайтам моноклонов и характеристики полученных моноклонов находятся на финальной стадии проведения.

Список использованных источников:

1. Khalimova A.A., Orlov A.S., Taube A.A. Analysis of Biopharmaceutical Manufacturing Localisation in Russia Considering the Country of Origin of Active Pharmaceutical Ingredients //Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya. 2024. Vol. 14, № 1. P. 53–61.
2. Костин, К. Б. Современная конъюнктура и позиции России на мировом биотехнологическом рынке / К. Б. Костин, А. Р. Фридман // Вопросы инновационной экономики. – 2025. – Т. 15, № 1.