

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**URŠKA MEKINDA**

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA MEKINDA

**VREDNOTENJE SELEKCIJE CELIC CHO Z EKSPRESIJO RECEPTORJA ZA  
FOLNO KISLINO V ZGODNJEM RAZVOJU BIOLOŠKIH ZDRAVIL**

**EVALUATION OF CHO CELL LINE SELECTION WITH FOLIC ACID  
RECEPTOR EXPRESSION IN BIOPHARMACEUTICAL EARLY PHASE  
DEVELOPMENT**

Ljubljana, 2017

Magistrsko naložko sem opravljala na oddelku Celična in molekularna biologija v Lek, d.d., pod mentorstvom dr. Dominika Gaserja in prof. dr. Boruta Štruklja, s Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

### **Zahvala**

Ob tej priložnosti bi se rada zahvalila mentorjem prof. dr. Borutu Štruklu, mag. farm., in dr. Dominiku Gaserju, mag. farm. za vso strokovno pomoč in koristne nasvete pri izdelavi magistrskega dela. Za prijazno pomoč in praktične nasvete pri izvedbi laboratorijskega dela magistrske naloge pa se močno zahvaljujem dr. Urošu Jamnikarju, dr. Tanji Ficko Trček in vsem preostalim zaposlenim na oddelku Celična in molekularna biologija, Lek d.d.

Predvsem pa se želim zahvaliti vsem mojim bližnjim, ki so me vedno podpirali, spodbujali in razumevajoče spremljali mojo študijsko pot.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko naložko izdelala samostojno pod mentorstvom dr. Dominika Gaserja, vodjo oddelka Celična in molekularna biologija (Lek, d.d.) in prof. dr. Boruta Štruklja s Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

Ljubljana, 2017

Lastnoročni podpis:

Predsednica magistrske komisije: prof. dr. Janja Marc  
Mentor: prof. dr. Borut Štrukelj  
Somentor: dr. Dominik Gaser  
Član magistrske komisije: izr. prof. dr. Simon Žakelj

<b>POVZETEK .....</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VII</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Biološka zdravila .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Tehnologija rekombinantne DNA .....	2
1.1.2 Ekspresijski vektor .....	3
1.1.3 Ekspresijski sistemi .....	4
1.1.4 Vnos genetskega materiala v gostiteljsko celico .....	5
1.1.5 Proces razvoja produkcijske celične linije.....	7
1.1.6 Selekcija .....	8
1.1.8 Folna kislina in njena vloga .....	10
1.1.9 Prenašalni sistemi folatov.....	13
1.1.10 Pomanjkanje folata.....	15
1.1.11 Uporaba folne kisline kot selekcijski označevalec .....	15
<b>2 NAMEN DELA .....</b>	<b>17</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Materiali .....</b>	<b>18</b>
3.1.1 Laboratorijska oprema .....	18
3.1.2 Kemikalije in reagenti .....	19
3.1.3 Celična kultura in rastni medij .....	20
3.1.4 Ekspresijski vektor .....	20
3.1.5 Selekcija .....	20
<b>3.2 Načrt poskusov.....</b>	<b>21</b>
3.2.1 <i>Poskus I</i> Testiranje vpliva znižane folne kisline v rastnem mediju pri netransficiranih celičnih linijah	21
3.2.2 <i>Poskus II</i> Testiranje vpliva kombinacije folne kisline in metotreksata v rastnem mediju pri transficirani celični liniji CHO-Der5 .....	22
3.2.3 <i>Poskus III</i> Adaptacija CHO-Der5 celične linije na znižano koncentracijo folne kisline pred transfekcijo.....	23

<b>3.3 Metode .....</b>	<b>24</b>
3.3.1 Odmrzovanje celične kulture.....	24
3.3.2 Vzorčenje celične kulture na aparatu <i>Vi-CELL</i> .....	24
3.3.3 Kultivacija celične kulture .....	24
3.3.4 Zamrzovanje celične kulture .....	25
3.3.5 Linearizacija ekspresijskega vektorja .....	25
3.3.6 Elektroforeza nukleinskih kislin na agaroznem gelu.....	26
3.3.7 Transfekcije.....	26
3.3.8 Preverjanje uspešnosti transfekcij s pretočnim citometrom <i>BD FACScalibur</i> .....	27
3.3.9 Selekcija .....	27
Selekcija s folno kislino in metotreksatom (testirani protokol) .....	27
3.3.10 Spremljanje celične produktivnosti .....	28
3.3.11 Merjenje produktivnosti na aparatu <i>Octet QK</i> .....	29
3.3.12 Priprava celičnih peletov .....	30
3.3.13 Izolacija nukleinskih kislin na aparatu <i>QIAcube</i> .....	30
3.3.14 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR) .....	31
3.3.15 Preverjanje števila kopij gena <i>FRα*</i> z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR)....	32
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Poskus I .....</b>	<b>35</b>
4.1.1 Vpliv znižane koncentracije folne kisline v rastnem mediju na viabilnost celic pri parentalnih celičnih linijah <i>CHO-Der1, -Der2, -Der3</i> in <i>-Der5</i> .....	35
4.1.2 Vpliv znižane folne kisline na rast parentalne celične linije <i>CHO-Der5</i> .....	40
<b>4.2 Poskus II .....</b>	<b>41</b>
4.2.1 Vpliv znižane koncentracije folne kisline in dodatka metotreksata pri transficirani celični liniji <i>CHO-Der5</i> 41	41
4.2.2 Produktivnost po selekciji z znižano koncentracijo folne kisline in dodatku MTX.....	46
<b>4.3 Poskus III .....</b>	<b>51</b>
4.3.1 Primerjava regeneracije in produktivnosti <i>CHO-Der5</i> celične linije pri adaptaciji na znižano koncentracijo folne kisline pred transfekcijo .....	51
4.3.2 Določanje števila kopij gena <i>FRα*</i> pri transficiranih zbirkih .....	53
<b>5 SKLEP .....</b>	<b>54</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>55</b>

**KAZALO SLIK**

<b>Slika 1</b> Prikaz tehnologije rekombinantne DNA .....	3
<b>Slika 2</b> Shema ekspresijskega vektorja .....	4
<b>Slika 3</b> Princip delovanja elektroporacije - pojav hidrofilne pore v celični membrani .....	6
<b>Slika 4</b> Prikaz začetne faze razvoja produksijske celične linije .....	8
<b>Slika 5</b> Sestava folne kisline .....	11
<b>Slika 6</b> Reducirani folat 5-CH <sub>3</sub> -THF (levo), metotreksat (desno) .....	11
<b>Slika 7</b> Metabolizem folatov .....	12
<b>Slika 8</b> Mehanizem regulacije izražanja folatnih receptorjev .....	14
<b>Slika 9</b> Potek <i>Poskusa I</i> .....	21
<b>Slika 10</b> Potek <i>Poskusa II</i> .....	22
<b>Slika 11</b> Potek <i>Poskusa III</i> .....	23
<b>Slika 12</b> Konica biosenzorja .....	29
<b>Slika 13</b> Princip merjenja produktivnosti na aparatu <i>Octet QK</i> .....	30
<b>Slika 14</b> Krivulja pomnoževanja pri qPCR .....	32

**KAZALO PREGLEDNIC**

<b>Preglednica I</b> Restriktijska mešanica za linearizacijo ekspresijskega vektorja .....	25
<b>Preglednica II</b> Transfekcije CHO-Der5 celične linije.....	27
<b>Preglednica III</b> Shema vzorčenja zbirkov med 14-dnevno šaržo z dohranjevanjem .....	28
<b>Preglednica IV</b> Uporabljeni seti začetnih oligonukleotidov.....	33
<b>Preglednica V</b> Pogoji pomnoževanja na qPCR .....	33
<b>Preglednica VI</b> Sestava reakcijske mešanice .....	34
<b>Preglednica VII</b> Koncentracija folne kisline in MTX pri zbirkih .....	43

## KAZALO GRAFOV

<b>Graf 1</b> Povprečje viabilnosti parentalne celične linije CHO-Der1 pri znižani koncentraciji folne kisline .....	36
<b>Graf 2</b> Povprečje viabilnosti parentalne celične linije CHO-Der2 pri znižani koncentraciji folne kisline .....	37
<b>Graf 3</b> Povprečje viabilnosti parentalne celične linije CHO-Der3 pri znižani koncentraciji folne kisline .....	38
<b>Graf 4</b> Povprečje viabilnosti parentalne celične linije CHO-Der5 pri znižani koncentraciji folne kisline .....	39
<b>Graf 5</b> Povprečje gostote celic parentalne celične linije CHO-Der5 pri različnih koncentracijah folne kisline.	
.....	40
<b>Graf 6</b> Povprečja viabilnosti zbirkov celične linije CHO-Der5 po transfekciji .....	43
<b>Graf 7</b> Gostota celic zbirkov med 14-dnevno dohranjevalno šaržo .....	46
<b>Graf 8</b> Viabilnost celic zbirkov med 14-dnevno dohranjevalno šaržo .....	47
<b>Graf 9</b> Produktivnost zbirkov med 14-dnevno dohranjevalno šaržo .....	47
<b>Graf 10</b> Povprečje produktivnosti zbirkov celične linije CHO-Der5 med 14-dnevno dohranjevalno šaržo ..	48
<b>Graf 11</b> Primerjava produktivnosti zbirkov celične linije CHO-Der5 .....	49
<b>Graf 12</b> Viabilnost adaptiranih in neadaptiranih zbirkov po transfekciji .....	51
<b>Graf 13</b> Produktivnost adaptiranih in neadaptiranih zbirkov na zadnji dan 14-dnevne dohranjevalne šarže .	52
<b>Graf 14</b> Število kopij gena <i>FRα*</i> pri zbirkih .....	53

## POVZETEK

Z odkritjem tehnologije rekombinantne DNA se je v farmaciji pojavilo novo področje zdravil, ki se bliskovito širi in razvija – sodobna biološka zdravila. Od običajnih sintetičnih zdravil se razlikujejo v tem, da je zdravilna učinkovina biološka molekula in so za njeno sintezo potrebni živi organizmi. Največji delež na trgu sodobnih bioloških zdravil trenutno predstavljajo terapevtska rekombinantna protitelesa. Zaradi kompleksne zgradbe terapevtskih rekombinantnih protiteles se za njihovo industrijsko proizvodnjo najpogosteje uporablajo sesalske celice, bolj natančno ovarijske celice samice kitajskega hrčka (CHO). Celice CHO so evolucijsko dovolj napredne, da zagotovijo ustrezne posttranslacijske spremembe in zvitje proteina, kar se odraža na kvaliteti produkta.

Proces razvoja biološkega zdravila se prične s sintezo ekspresijskega vektorja, ki mora v osnovi vsebovati rekombinantni tarčni gen, z ustreznimi transkripcijskimi regulatornimi elementi, in selekcijske gene.

V magistrski nalogi smo testirali novo selekcijsko metodo in ovrednotili njeno uporabo pri produkciji CHO-*Der5* celični liniji v zgodnjem razvoju bioloških zdravil. Selekcija temelji na izražanju gena za mutirani folatni receptor  $\alpha$  in dihidrofolatno reduktazo. Spremljali smo vpliv znižanja folatov v rastnem mediju na celično viabilnost, ter določili najnižjo koncentracijo folne kisline v rastnem mediju, ki parentalnim celicam še omogoča rast. Nato smo CHO-*Der5* transficirali z ekspresijskim vektorjem, ki je vseboval aminokislinsko zaporedje za lahko in težko verigo monoklonskega protitelesa ter gena za mutirani folatni receptor  $\alpha$  in dihidrofolatno reduktazo, ki sta predstavljala selekcijska označevalca. Po selekciji z različnimi koncentracijami folne kisline in metotreksata v rastnem mediju, smo zbirke nacepili na šaržo z dohranjevanjem in z merjenjem produktivnosti rekombinantnega monoklonskega protitelesa določili najbolj učinkovito selekcijo za celično linijo CHO-*Der5*. Prav tako smo preučili možnost adaptacije parentalnih celic na znižano koncentracijo folne kisline v rastnem mediju in ovrednotili njen vpliv na regeneracijo in produktivnost transficiranih zbirkov.

Glede na rezultate lahko zaključimo, da mutirani folatni receptor  $\alpha$  in dihidrofolatna reduktaza predstavlja selekcijska označevalca, s katerima lahko dosežemo visoko produksijsko celično linijo CHO-*Der5*.

Ključne besede: biološka zdravila, celična linija CHO, selekcija, folatni receptor

## ABSTRACT

With the development of recombinant DNA technology, a new wave of therapeutics emerged, which is among the fastest-growing medicines today – biopharmaceuticals. Compared to the more traditional, small-molecule drugs, the active pharmaceutical ingredient in biopharmaceutical is a biological molecule and comes from a living organism. The biggest part in biopharmaceutical market represent recombinant monoclonal antibodies. Due to structural complexity of monoclonal antibodies, the principle host for their production are mammalian cells, especially Chinese hamster ovary cells (CHO). CHO cells have the ability required for efficient post-translational modifications and protein folding, which result in high product quality.

Every production cell line development starts with expression vector design, which in generally contains recombinant gene of interest, with the necessary transcriptional regulatory elements, and genes for selection.

In this master thesis we tested a novel selection approach and evaluated its use with production CHO-*Der5* cell line in early biopharmaceutical development. This selection method is based on a mutated folate receptor  $\alpha$  and dihydrofolate reductase expression. Firstly, parental cells were cultured in growth medium containing different concentrations of folates to determine the lowest concentration necessary, for cells to grow. Afterwards, we transfected CHO-*Der5* cell line with expression vector, containing amino sequence for heavy and light chain of monoclonal antibody along with mutated folate receptor  $\alpha$  and dihydrofolate reductase as a selective markers. Using different selection conditions, with reducing folic acid and adding methotrexate to growth medium, pools were seeded on fed-batch and, based on cell productivities, the most efficient concentration of selective agents was determined. Additionally, we adapted parental cells to low folate growth medium prior transfection and evaluated a possible influence on cell productivity or time, needed for cells to overcome stringent selective pressure.

Based on the results, we can conclude, that mutated folate receptor  $\alpha$  and dihydrofolate reductase represent efficient selective markers for developing a high producing CHO-*Der5* cell line.

Key words: biopharmaceuticals, CHO cell line, selection, folate receptor

**SEZNAM OKRAJŠAV**

ADCC	od protitelesa odvisna celična citotoksičnost
ATP	adenozin trifosfat
bp	bazni par
CHO	ovarijske celice kitajskega hrčka
CMV	citomegalovirus
Cq	pražni cikel
DHF	dihidrofolat
DHFR	dihidrofolatna reduktaza
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dTMP	deoksi timidin monofosfat
dUMP	deoksi uridin monofosfat
EF-1 $\alpha$	elongacijski faktor alfa
FA	folna kislina
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila
FR	folatni receptor
FR $\alpha$	folatni receptor alfa
FR $\alpha$ *	mutirani folatni receptor alfa
G6PD	glukoza-6-fosfat dehidrogenaza
gDNA	genomska deoksiribonukleinska kislina
GFP	zeleni fluorescentni protein
GLUC	glukagon
GS	glutamin sintetaza
HCY	homocistein
hnRNP-E1	heterogeni nuklearni ribonukleoprotein
mAB	monoklonsko protitelo
mRNA	prenašalna ribonukleinska kislina
MSX	metionin sulfoksimin
MTX	metotreksat
NADPH	nikotinamídadeníndínukleotídfosfát
ORI	začetno mesto replikacije

PBS	fosfatni pufer s soljo
PCFT	s protoni sklopljen folatni prenašalec
PCR	verižna reakcija s polimerazo
pDNA	plazmidna deoksirobonukleinska kislina
qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
RFC	reducirani folatni prenašalec
SAM	S-adenozil metionin
SV40	simian virus 40
THF	tetrahidrofolat
UV	ultravijolična

# 1 UVOD

## 1.1 Biološka zdravila

Biotehnologija velja za eno najhitreje rastočih področij znanosti v zadnjih desetletjih in nič ne kaže na to, da bi se ustavila. Z razvojem tehnologije rekombinantne DNA je nastopilo novo poglavje v sodobni farmaciji. Pojavila se je povsem nova veja zdravil – sodobna biološka zdravila, katerih značilnost je, da je zdravilna učinkovina biološka molekula.

Prva biološka zdravila so bila preprosto izolirana iz živalskih ali človeških tkiv; tako sta Frederick Banting in Charles Best leta 1922 prvič izolirala inzulin iz živalske trebušne slinavke in z njim zdravila dečka, obolelega z diabetesom tipa I (1). Takšna zdravila so bila na razpolago v omejenih količinah, bolniki so bili izpostavljeni veliki imunogenosti, obstajala pa je tudi možnost okužbe s prionskimi beljakovinami. Druga prelomnica v razvoju bioloških zdravil se je pojavila 60 let kasneje, ko so izolirali prvi rekombinantni protein (Humulin® - človeški inzulin) (1). Z razvojem rekombinantne tehnologije in ostalih metod molekularne biologije, kot je PCR, se je nadaljeval razvoj bioloških zdravil, ki se najpogosteje uporablajo za zdravljenje rakavih in imunskeh obolenj. Od januarja 2010 do julija 2014 je bilo na ameriškem in evropskem trgu v povprečju odobrenih skoraj 13 bioloških zdravil letno, leta 2013 pa je prodaja bioloških zdravil znašala kar 130 milijard ameriških dolarjev (2).

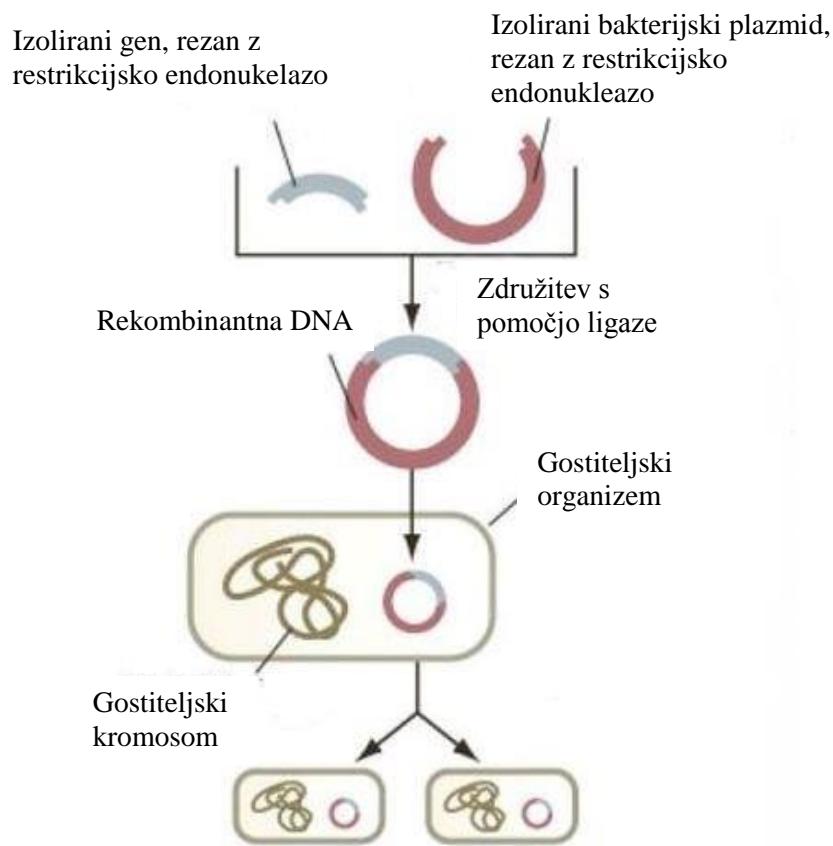
Med običajnim sintetičnim zdravilom in sodobnim biološkim zdravilom obstaja precej razlik. Molekula biološkega zdravila je nekaj tisočkrat večja od sintezne molekule, v večini primerov pa gre za protein ali nukleinsko kislino. Gre za zelo kompleksne učinkovine, z zapleteno tridimenzionalno strukturo in prav njena pravilna oblika je nujna za učinkovito delovanje. Razlike najdemo tako v kompleksnosti in zgradbi molekule, kot načinu same sinteze – za produkcijo bioloških zdravil so namreč potrebni živi organizmi, proces proizvodnje pa mora biti strogo nadzorovan, saj so biološke molekule izredno občutljive na vsakršno spremembo okolja. Med samim procesom proizvodnje biološkega zdravila lahko pride do spremembe v nativni obliki molekule, kar v bolnikovem organizmu lahko povzroči nastanek specifičnih protiteles in s tem zmanjša učinkovitost zdravila ali pa jo popolnoma uniči. V primerjavi z majhnimi sinteznimi molekulami, je tudi karakterizacija končne biološke učinkovine precej zahtevnejša (3).

Zadnja leta se vse izboljšave na področju bioloških zdravil nanašajo na večjo učinkovitost in varnost zdravila, hitrejši proces in nižjo ceno proizvodnje ter iskanje novih terapevtskih tarč. Za prihodnost se napoveduje konstantno rast prodaje bioloških zdravil, med katerimi bodo največji delež predstavljal rekombinantna monoklonska protitelesa (2).

### 1.1.1 Tehnologija rekombinantne DNA

Odkritje tehnologije rekombinantne DNA velja za enega največjih znanstvenih dosežkov, saj je prav to omogočilo odskočno desko za vse nadaljnje poskuse pri razvoju bioloških zdravil. Leta 1973 sta Cohen in Boyer v Kaliforniji sintetizirala prvi organizem z rekombinantno DNA, vendar so bili začetni odzivi znanstvenikov nekoliko zadržani, saj je človeštvo prvič pričelo posegati v dednino – genom (4). Kasneje se je izkazalo, da je uporaba rekombinantne tehnologije pod ustreznim nadzorom varna in lahko reši številna življjenja. Revija Time Magazine je v svoji izdaji ob novem tisočletju odobrilev prvega rekombinantnega zdravila s strani Ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA) uvrstila med sto najpomembnejših dosežkov medicine 20. stoletja (4)

Pri tehnologiji rekombinantne DNA gre za postopek izolacije določenih genskih zaporedij in združitev teh v obstoječi genom drugega organizma, pri katerem takšni geni naravno ne obstajajo. Združevanje različnih genov je omogočilo odkritje restrikcijskih endonukleaz v 70. letih; posebnih encimov, ki prepoznajo specifično zaporedje DNA molekule in jo na tistem mestu cepijo. Izolirani gen s pomočjo encimov ligaz preko restrikcijskih mest vstavimo v biološki nosilec (t.i. vektor) in ga vnesemo v gostiteljski organizem, kjer se neodvisno pomnožuje (Slika 1). Vstavljeni tarčni gen (tj. rekombinantna DNA) se lahko nato v gostiteljskem organizmu prepiše in prevede v polipeptid (oz. zdravilno učinkovino), ki ga vstavljeni gen kodira.



**Slika 1** Prikaz tehnologije rekombinantne DNA

### 1.1.2 Ekspresijski vektor

Proces razvoja biološkega zdravila se začne z načrtovanjem in sintetiziranjem ekspresijskega vektorja, ki predstavlja nosilec, s katerim poljuben polinukleotid vnesemo v tarčni organizem (gostiteljsko celico). Ekspresijski vektor narekuje potek translacije tarčnega gena, ki kodira rekombinantni protein in vsebuje vsaj en selekcijski označevalec, s katerim je moč izločiti rekombinantni organizem. (5, 6).

Glede vrste nosilca lahko te razdelimo na plazmide, bakteriofage, kozmide, virusne vektorje itd. Kot virusne nosilce se pogosto uporablja adenoviruse, lentiviruse ali retroviruse (7), kar pa je sprožilo veliko vprašanj o varnosti in se zato pri proizvodnji bioloških zdravil zelo redko uporablja (8). Zadnje čase se zaradi vprašanja varnosti pri proizvodnji bioloških zdravil pogosteje poslužujemo uporabi ne-virusnih vektorjev, to je gole plazmidne DNA (7,9).

Med glavne elemente ekspresijskega vektorja, ki so nujni za uspešno izražanje tarčnega gena, uvrščamo: 1) poliklonsko mesto, ki je kratek odsek DNA s številnimi restriktijskimi mesti, s pomočjo katerih vstavimo tarčni gen v vektor 2) začetno mesto replikacije (ORI) 3) promotorsko regijo in 4) selekcijski označevalec, ki omogoča razlikovanje med gostiteljskimi organizmi z ekspresijskim vektorjem in brez (Slika 2) (9).



**Slika 2** Shema ekspresijskega vektorja

Ekspresijska kasetta (poliklonsko mesto) je na eni strani pod vplivom promotorja, ki je najpogosteje CMV, EF-1 alfa ali SV40 (10), in poliadenilacijskega signala na drugi strani. Pri multimernih proteinih se mora v isti gostiteljski celici izraziti več podenot. V primeru monoklonskega protitelesa sta lahko ekspresijski kaseti za težko in lahko verigo na istem ekspresijskem vektorju ali pa na dveh, kjer vsak izmed njiju nosi zapis za eno izmed podenot.

### 1.1.3 Ekspresijski sistemi

Ključni del rekombinantne tehnologije je ekspresijski sistem, ki predstavlja nekakšno tovarno za želeni produkt. Prvi ekspresijski sistem, ki so ga uporabili za biološka zdravila je bila bakterijska celica *Escherichia coli* (*E. coli*), kasneje pa so v ta namen uporabljali tudi druge bakterije, glice in rastline ter živalske in človeške celične linije (10). Pri izbiri ekspresijskega sistema za proizvodnjo bioloških zdravil je pomembnih več dejavnikov (sposobnost posttranslacijskih sprememb, učinkovitost izločanja produkta, cena procesa itd.), v prvi vrsti pa je potrebno upoštevati kriterij varnosti in čim večjo podobnost rekombinantnega proteina z naravnim. Trenutno je proizvodnja takšnih zdravil najbolj razširjena predvsem na bakteriji *E. coli*, nekaterih kvasovkah (npr.: *Saccharomyces*

*cerevisiae*) in sesalskih celicah (3). Med sesalskimi celicami se uporabljo predvsem ovarijske celice kitajskega hrčka (CHO), mišje mielomske celice (NS0 in Sp2/0), ledvične celice mladiča hrčka (BHK) in v majhnem odstotku človeške celice, kot so človeške zarodne ledvične celice (HEK-293) in celice človeške mrežnice (PER C6) (6, 11). Vse naštete celične linije so sposobne rasti v suspenziji. Končna izbira ekspresijskega sistema je odvisna od kompleksnosti produkta, ki ga želimo izolirati. Preprostejša biološka zdravila (npr. inzulin) se lahko sintetizirajo v enostavnnejših organizmih (npr. bakterijskih celicah), medtem ko se pri rekombinantnih terapevtskih protitelesih v veliki večini odločijo za proizvodnjo v sesalskih celičnih linijah. Te so namreč evolucijsko dovolj razvite za zahtevne posttranslacijske spremembe, ki so nujne pri sintezi protiteles (npr. glikozilacija, N-acetilacija, tvorba disulfidnih vezi) (3, 10).

Za industrijsko proizvodnjo rekombinantnih terapevtskih protiteles se najpogosteje uporablja celična linija CHO, ki izvira iz ovarijskih celic samice kitajskega hrčka, kljub relativno visokim stroškom proizvodnje (3). Začetki uporabe CHO celične linije segajo v leto 1957, ko je Dr Theodore T. Puck prvič izoliral ovarij iz samice kitajskega hrčka in uspešno ustvaril celično kulturo (12). Kmalu je bilo jasno, da je nova celična linija zelo primerna za *in vitro* gojenje. Celična linija CHO se tako pogosto uporablja tudi zaradi njene varnosti, saj ne prenaša nekaterih najpogostejših človeških patogenih virusov (13). Prav tako pa je zaradi večje varnosti pri proizvodnji bioloških zdravil celična linija CHO adaptirana na rast v brezserumskem rastnem mediju (6). Leta 1987 je FDA odobrila prvo rekombinantno zdravilo (tkivni plazminogenski aktivator), ki so ga izdelali z uporabo celične linije CHO, danes pa se s pomočjo te celične linije proizvede skoraj 70 % vseh rekombinantnih terapevtskih proteinov (14). Do danes je bilo oblikovanih že veliko modifciranih različic CHO celične linije, med katerimi je najbolj poznana CHO z delecijo gena *dhfr* (15).

#### 1.1.4 Vnos genetskega materiala v gostiteljsko celico

Postopek vnosa rekombinantne DNA v celico imenujemo transfekcija, s čimer pridobimo genetsko spremenjen organizem oziroma rekombinatni organizem. Ravno transfekcija omogoča razvoj terapevtskih rekombinantnih proteinov, ki so produkt vnosa specifičnega gena v ustrezni ekspresijski sistem. Obstajajo različne tehnike, s katerimi povzročimo, da rekombinantna DNA prehaja lipidni dvosloj celične membrane in na ta način vstopi v celico. V grobem jih delimo na fizikalne (npr.: elektroporacija, uporaba ultrazvoka,

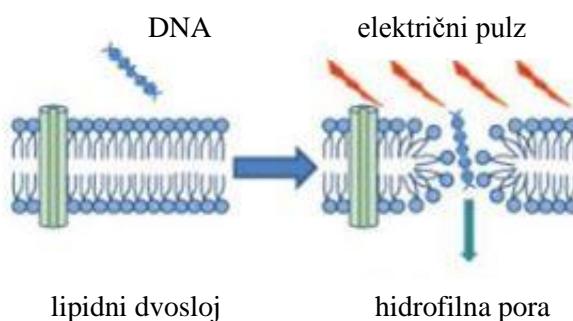
magnetnega polja, mikroinjiciranje), kemične (npr.: uporaba kalcijevega fosfata ali liposomov) in biološke metode (6, 8).

Poznamo stabilno in prehodno transfekcijo. Pri stabilni transfekciji se vneseni transgeni material ohrani tudi po celični delitvi, saj vstavljeni rekombinantna DNA vstopi v celično jedro in se vgradi v genom gostiteljske celice. Prehodna transfekcija transgenemu materialu ne omogoča vstopa v celično jedro, zato se ta material hitro izgubi. Mesto vgradnje je naključno, imelo pa naj bi velik vpliv na izražanje rekombinantnega proteina in nadaljnje procese, zato potekajo številne raziskave za specifično mesto vgradnje rekombinantne DNA (6, 9).

Pred transfekcijo lahko ekspresijski vektor lineariziramo, s čimer razklenemo krožno obliko molekule, za kar se uporabljo restriktivne endonukleaze. Lineariziran ekspresijski vektor ima na ta način več možnosti, da se vgradi v celični genom (6).

#### **1.1.4.1 Elektroporacija**

Med fizičnimi metodami za vnos rekombinantne DNA v celični ekspresijski sistem najpogosteje uporabljamo elektroporacijo. Znano je, da se prepustnost celične membrane pod vplivom mikro-milisekundnega zunanjega električnega impulza prehodno poveča, kar dopušča prehod makromolekul v notranjost celice. Na lipidnem dvošloju se za kratek čas ustvarijo pore, velike nekaj nanometrov, skozi katere lahko rekombinantna DNA prehaja v celico (Slika 3) (16, 17).



**Slika 3** Princip delovanja elektroporacije - pojav hidrofilne pore v celični membrani

Prva uporaba elektroporacije za namen genskega inženirstva sega v leto 1982, ko je Neumann s sodelavci prvič uspešno omogočil prehod rekombinantne DNA v gostiteljsko

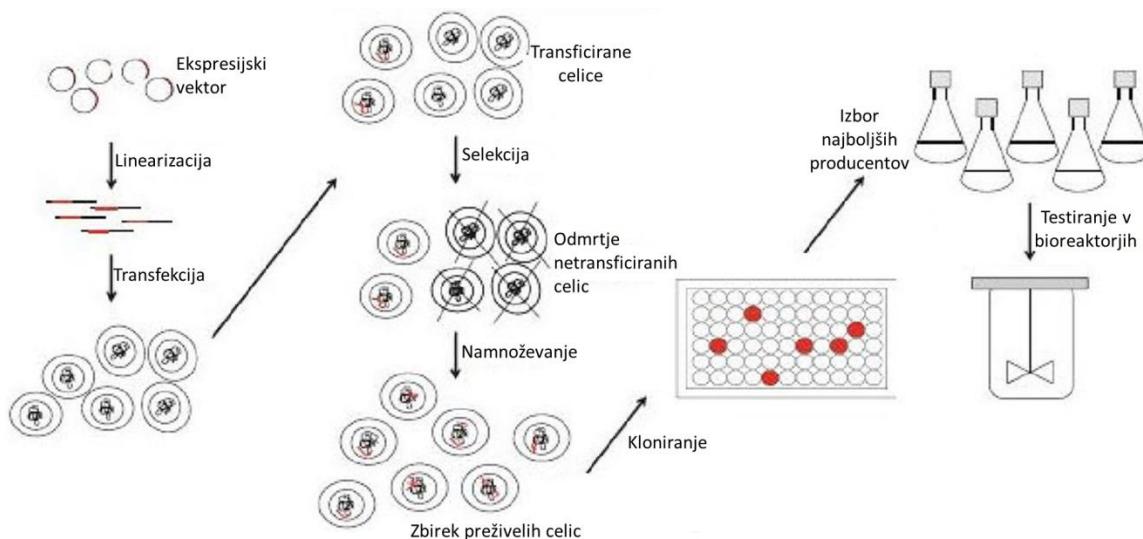
celico s pomočjo elektroporacije (18). Od ostalih metod, ki so že obstajale v takratnem času, je izstopala predvsem zaradi visoke učinkovitosti (19). Za visoko učinkovitost transfekcije je pomembna dobra optimizacija metode, najbolj kritična parametra pri elektroporaciji pa sta jakost dovedene električne napetosti in trajanje električnega impulza (8).

#### 1.1.5 Proces razvoja produkcijske celične linije

Pri sintetičnem zdravilu je poti do končne zdravilne učinkovine lahko več, kljub temu pa je sintetična molekula na koncu procesa enaka po zgradbi in učinkovitosti. Pri biološkem zdravilu pa je proces veliko bolj kompleksen, saj gre za pridobivanje učinkovine s pomočjo živih organizmov. Proses mora biti v vseh stopnjah do potankosti nadzorovan, saj lahko na vsakem koraku pride do spremembe v končni strukturi biološke molekule. (3)

Za učinkovit rekombinantni protein ni dovolj le ustrezna aminokislinska veriga, vendar vsak posamezen korak v procesu. Pomembna je uspešna transfekcija gostiteljskih celic, transkripcija vstavljenega gena, transkripcija v mRNA, ustrezno sestavljanje in zvijanje nastalega proteina ter njegovo izločanje iz celice. Proses razvoja produkcijske celične linije je dolgotrajen in zahteven, saj je potrebna natančna optimizacija vsakega posameznega koraka.

V grobem lahko celoten proces razdelimo na nekaj ključnih korakov (Slika 4): 1) sinteza ustreznega ekspresijskega vektorja in izbor ustreznega gostiteljskega organizma 2) vnos rekombinantne DNA v gostiteljski organizem 3) selekcija z antibiotikom 4) okrevanje in ekspanzija 5) amplifikacijska selekcija z MTX ali MSX 6) izbor najboljših producentov 7) kloniranje 8) testiranje najboljših producentov v manjših bioreaktorjih (6, 9).



**Slika 4** Prikaz začetne faze razvoja produkcijske celične linije.

### 1.1.6 Selekcija

Cilj razvoja je produkcijska celična linija, ki tarčni gen stabilno vgradi v genom in ga v veliki količini tudi proizvaja. Vse gostiteljske celice ne sprejmejo ekspresijskega vektorja, zato je tak dogodek redek in le manjši del populacije transficiiranih celic v zadostnih količinah izraža tarčni gen. V ta namen ekspresijski vektor sintetiziramo tako, da poleg tarčnega gena vanj vstavimo tudi sekvenco za seleksijski gen, s katerimi izločimo neuspešno transficiirane celice. Poznamo različne načine selekcije, med njimi rezistenco na antibiotik in selekcije, ki izkoriščajo celične metabolne poti.

#### 1.1.6.1 Selekcija z antibiotiki

Začetki selekcije z antibiotikom segajo v leto 1982, ko so Southern in sodelavci prvič dokazali odpornost transformiranih celic na neomicinske/kanamicinske antibiotike. V ekspresijski vektor SV40 so vstavili bakterijski gen (*neo*) za rezistenco na antibiotik. Po dodatku geneticina so dosegli, da so seleksijske pogoje preživele le celice, ki so ta gen sprejele in ga izrazile (20). Geni za rezistenco na antibiotik pogosto izhajajo iz mikrobnih organizmov in kodirajo encime, ki razgrajujejo določeno vrsto antibiotika (9).

#### 1.1.6.2 Selekcija z metabolnimi označevalci

Pri selekciji z metabolnim označevalcem izkoriščamo endogene encime, ki imajo ključno vlogo v celičnem metabolizmu. V industriji najpogosteje uporabljeni metabolni

selekcijiska označevalca sta encima glutamin sintetaza (GS) in dihidrofolatna reduktaza (DHFR) (6, 9).

Glutamin sintetaza je encim, ki iz glutamata in amonijaka omogoča sintezo glutamina, to pa je tudi edina pot nastajanja te aminokisline v sesalskih celicah. V primeru pomanjkanja GS celica torej ni sposobna sinteze glutamina, kar se je izkazalo za uspešno uporabo pri selekciji. Nekatere celične linije (npr. mišje mielomske celice) nimajo endogene GS, zato bodo v rastnem mediju brez glutamina preživele le tiste, ki smo jih transficirali z genom za GS. V primeru CHO celične linije, ki že izražajo GS pa v rastni medij dodamo inhibitor GS metionin sulfoksimin (MSX) in na ta način izvedemo selekcijo (6, 21).

Drugi način metabolne selekcije temelji na delovanju dihidrofolatne reduktaze, ki je eden od esencialnih metabolnih encimov, ključen pri sintezi nukleotidov. Celice CHO so diploidi za gen *dhfr*, vendar so Urlaub in sodelavci v zgodnjih 80ih letih prejšnjega stoletja uspešno izolirali mutante CHO celične linije brez gena *dhfr* (DHFR-) (15, 22). Celična linija DXB11 ima delecijo enega alela za DHFR encim, medtem ko je drugi alel inaktiviran. Celična linija DG44 pa ima delecijo obeh alelov za gen *dhfr*, kar so dosegli z ionsko radiacijo (13). Po transfekciji z genom *dhfr* so torej v običajnem rastnem mediju preživele le uspešno transficirane celice. Z dodatkom metotreksata (MTX) v rastni medij in kompetititvni inhibiciji encima DHFR, pa lahko uporabimo tudi DHFR+ celične linije. MTX je namreč citostatik, ki zaradi strukturne podobnosti deluje kot antagonist folne kisline, na ta način inhibira encim DHFR in onemogoči tvorbo deoksi timidin difosfata (23). Funkcija DHFR encima je kataliza od NADP-odvisne redukcije dihidrofolata v tetrahidrofolat, ki pa je vir funkcionalnih skupin z enim ogljikom. MTX se na tarčo veže z milijon krat močnejšo afiniteto kot njegov naravni substrat (dihidrofolat) in ga na ta način inhibira (24).

Običajno v ekspresijskem vektorju združimo gen *dhfr* z genom za rezistenco na antibiotik (npr. *neo*). Gen za rezistenco na antibiotik služi preživetju uspešno transficiranih celic, primarna funkcija gena *dhfr* pa je pospeševanje amplifikacije ekspresijskega vektorja. Ekspresijski vektor je namreč lahko sintetiziran tako, da je tarčni gen povezan z amplifikacijskim genom (21). Z dodatkom MTX v rastni medij izvedemo seleksijski pritisk in povzročimo povečano transkripcijo gena *dhfr* (11, 25), poleg njega pa se pospešeno prepisuje tudi tarčni gen. S takšnim načinom povečamo celično produktivnost

(26) in lahko povzročimo tudi do več sto ali tisoč kopij integriranega plazmida v celičnih kromosomih (21, 27).

### 1.1.6.3 Novejši načini selekcije

Poleg omenjenih tehnik se uporablja tudi selekcijo, ki temelji na podlagi reduciranega folatnega prenašalca (RFC). Sesalske celične linije vsebujejo endogeni gen za RFC, ki ga je potrebno s tehnologijo izbijanja genov izbiti ali inaktivirati. Za ta namen mora biti celična linija mutirana na način, da ne vsebuje gena za RFC. RFC izkazuje visoko afiniteto za reducirane folate, kot je 5-metil-THF in 5-formil-THF, vendar ne za folno kislino, ki je oksidiran folat. Celice brez gena za RFC lahko transficiramo z *RFC* genom in jih s pomanjkanjem folatov v rastnem mediju izpostavimo selekcijskemu pritisku (28).

Pri metabolnih selekcijskih tehnikah pa se je pojavila tudi metoda, pri kateri glavno vlogo igrata folna kislina in receptor za folno kislino (tj. folatni receptor).

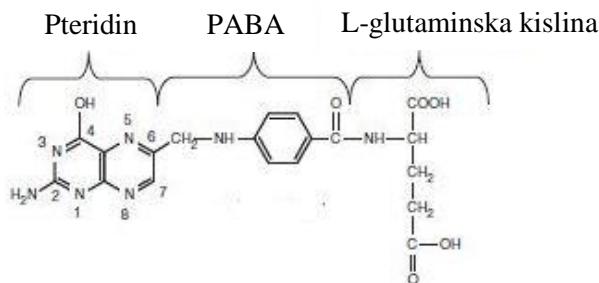
### 1.1.8 Folna kislina in njena vloga

Folna kislina in njen reducirani derivat tetrahidrofolat (THF) sta vodotopna vitamina, pogosto skupno imenovana folat. Ime folat izvira iz latinske besede *folium*, kar pomeni list; folate namreč najdemo predvsem v zeleni listnatih zelenjav. Folna kislina in preostali reducirani derivati folne kisline so esencialni kofaktorji in/ali koencimi pri biosintezi purinov, timidilata in nekaterih aminokislin v sesalskih celicah. Sodelujejo namreč pri prenosu skupin z enim ogljikovim atomom in imajo ključno vlogo pri sintezi, metilaciji in popravljanju celične DNA (29).

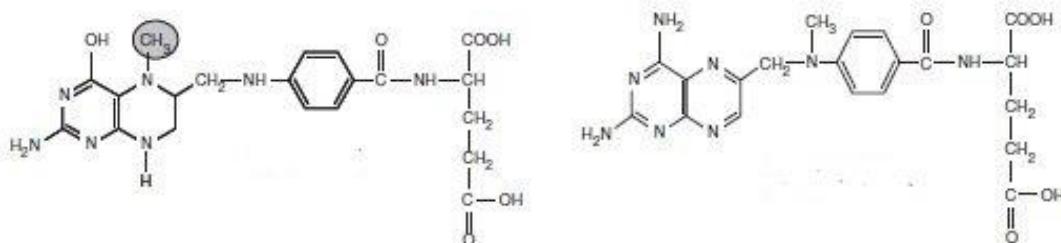
Folatni koencimi v metabolizmu nukleinskih kislin sodelujejo na dva načina: 1) sinteza DNA iz prekurzorjev (timidina in purinov) je odvisna od folatnih koencimov 2) folatni koencim je nujen za sintezo metionina iz homocisteina, metionin pa je potreben za sintezo S-adenozilmethionina (SAM). SAM deluje kot donor metilne skupine pri številnih reakcijah, tudi metilaciji DNA in RNA. Poleg tega folatni koencimi sodelujejo pri sintezi nekaterih aminokislin, kot so metionin, histidin, cistein, serin in glicin (5).

Folno kislino sestavlja tri med seboj kovalentno vezane komponente: pteridinski obroč, *p*-amino benzojska kislina (PABA) in L-glutaminska kislina (Slika 5). Sesalske celice so zmožne sintetizirati pteridinski obroč, vendar za razliko od prokariontov nimajo možnosti kovalentne vezave pteridinskega obroča s PABA. Rastline in glice torej imajo sposobnost

biosinteze notranjih zalog folatov, medtem ko evkarijontske celice nimajo ustreznega mehanizma in so odvisne od zunanjega vnosa. Pri gojenju sesalskih celic je torej nujno, da so folati prisotni v rastnem mediju (24).



**Slika 5** Sestava folne kisline



**Slika 6** Reducirani folat 5-CH<sub>3</sub>-THF (levo), metotreksat (desno)

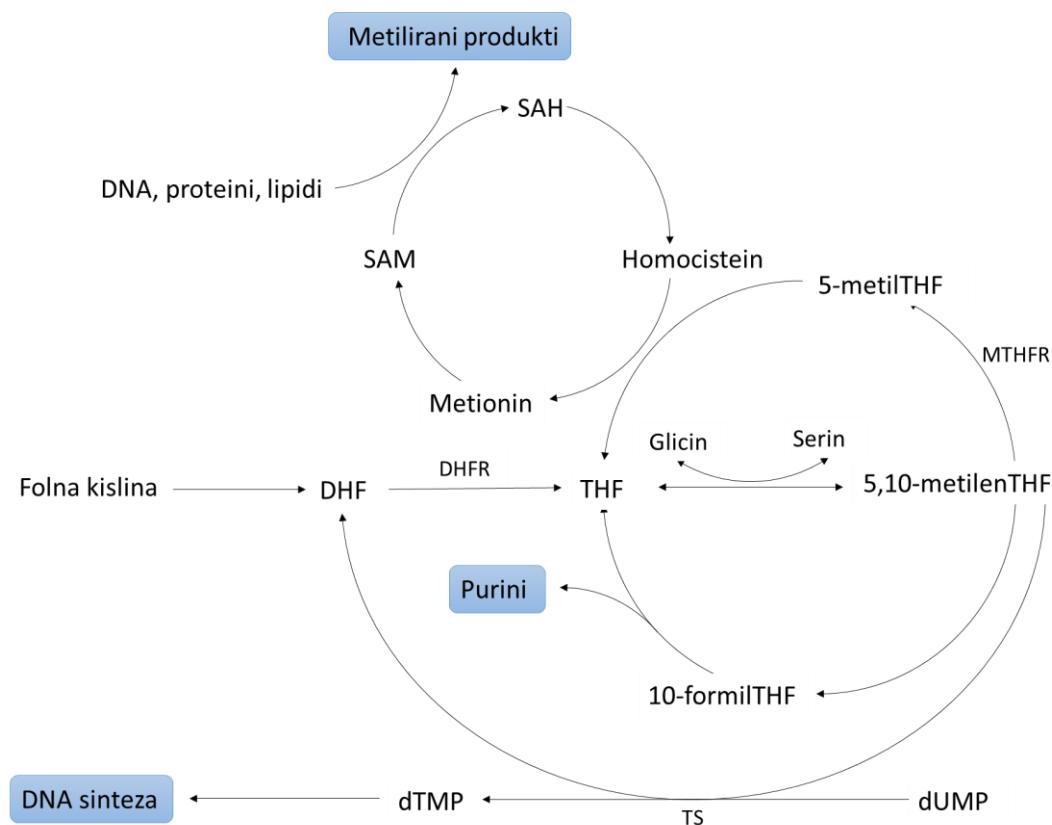
### 1.1.8.1 Metabolizem folatov

Folat ima v celičnem metabolizmu pomembno vlogo. Po vstopu v celico se s pomočjo encima folatne reduktaze najprej reducira do dihidrofolata (DHF) in nato z dihidrofolatno reduktazo (DHFR) do tetrahidrofolata (THF) (Slika 7). THF ima ključno vlogo, saj deluje kot akceptor skupin z enim ogljikom pri številnih reakcijah (24, 30):

- Pri pretvorbi serina v glicin je vir skupin z enim ogljikom običajno serin. V reakciji s THF tvori glicin in 5,10-metilenTHF. S prenosom skupine z enim ogljikom iz 5,10-metilenTHF na dUMP nastaja dTMP. 5,10-metilenTHF se pretvori v DHF in nato v THF.
- 5,10-metilenTHF se s pomočjo encima metilen tetrahidrofolatne reduktaze pretvori v 5-metilTHF. 5-metilTHF je donor metilne skupine, ki poskrbi za remetilacijo homocisteina (HCY) v metionin, pri čemer sodeluje encim metionin sintaza. Metilna skupina, ki se prenese s 5-metilTHF na HCY pa sodeluje pri nastanku SAM, za kar je potrebna tudi molekula ATP. Nastanek SAM predstavlja tudi

končno točko transmetilacijske poti. SAM je ključni donor skupin z enim ogljikom v metilacijskih reakcijah (metilacija DNA, proteinov ali lipidov).

- *De novo* sinteza purinov je deset stopenjska reakcija, pri kateri sta dve katalizirani s strani encimov, ki so odvisni od metabolizma folatov. Glicinamid ribonukleotid transformilaza je encim, ki katalizira prvo reakcijo, pri kateri s prenosom formilne skupine iz 10-formilTHF nastane imidazolni obroč purinov. Druga reakcija je katalizirana z aminoimidazol karboksamid ribonukleotid transformilazo, pri njej nastane intermediat inozin mohofosfat, ki je prekurzor za nastanek adeninskih in gvanozinskih nukleotidov (24, 30).



**Slika 7 Metabolizem folatov**

DHF - dihidrofolat; THF - tetrahidrofolat; SAM - S-adenozilmetonin; SAH - S-adenozilhomocistein; MTHFR - metilen tetrahidrofolatna reduktaza; DHFR – dihidrofolatna reduktaza; TS – timidilat sintaza; dTMP - deoksi timidin monofosfat, dUMP – deoksi uridin monofosfat

### 1.1.9 Prenašalni sistemi folatov

Pri sesalskih celicah poznamo tri neodvisne poti prevzemanja folatov iz okolice (31, 32):

- a) **Reducirani folatni prenašalec** (reduced folate carrier; RFC) je prevladujoči celični prenašalni sistem z visoko kapaciteto za reducirane folatne kofaktorje. Je 85 kDa velik membranski glikoprotein, ki ima visoko afiniteto za THF kofaktorje (npr. levkoverin) in majhno afiniteto za oksidirane folate, kot je folna kislina.
- b) **S protoni sklopljen folatni prenašalec** (proton coupled folate transporter; PCFT) je prenašalec, ki prenaša tako reducirane kot oksidirane folate, vendar deluje optimalno le v kislem okolju (pH 5,5), kar pa ni fiziološki pH.
- c) **Folatni receptorji** (FR) pa so družina visoko afinitetnih glikoproteinov, ki vežejo folat in jih kodirajo trije geni – FR $\alpha$ , FR $\beta$  in FR $\gamma$ .

V nadaljevanju se bomo osredotočili predvsem na folatne receptorje, saj so le ti vključeni v naše raziskovanje.

#### 1.1.9.1 Družina prenašalcev folatnih receptorjev (FR)

Folatni receptorji predstavljajo družino visoko afinitetnih folatnih prenašalcev, ki jih kodirajo trije različni geni: FR $\alpha$ , FR $\beta$  in FR $\gamma$ . Zreli FR so homologni proteini v večjem delu aminokislinske sekvence (68-79 %). Vsebujejo od 229 do 236 aminokislin in dve (FR $\beta$  in FR $\gamma$ ) ali tri (FR $\alpha$ ) mesta za potencialno N-glikozilacijo. N-glikozilacija ima velik vpliv na končno tridimenzionalno obliko molekule, kar pa se izraža v funkcionalnosti in aktivnosti proteina. Medtem ko je RFC dvosmerni prenašalec, FR prenašajo folate le v eno smer. FR $\alpha$  in FR $\beta$  sta oba z glikozil fosfatidilinozitolom na membrano sidrana proteina, ki prenašata folate s pomočjo endocitoze, medtem ko je FR $\gamma$  sekretorni protein (ni vezan na membrano). V splošnem FR izkazujejo visoko afiniteto za folno kislino in nizko za MTX. FR $\alpha$  in FR $\beta$  se precej razlikujeta v vezavi različnih stereoizomerov, tako se (S)-metilTHF pri FR $\alpha$  veže s petdesetkrat večjo afiniteto kot pri FR $\beta$ . FR $\alpha$  ima višjo afiniteto za številne antifolate (vključno z MTX) v primerjavi s FR $\beta$ , kar naj bi bila posledica različnih aminokislin blizu vezavnega mesta (31, 32, 33).

FR $\alpha$ , poznan tudi kot FOLR, je membransko vezan receptorski prenašalec, z visoko afiniteto za folno kislino ( $K_d = 0,1\text{-}1 \text{ nM}$ ) in veliko nižjo afiniteto za MTX ( $K_d = 100 \text{ nM}$ ). Prizem folne kisline v citosol se prične z vezavo molekule na receptor na površini membrane, čemur sledi uvhlanje membrane in tvorba endosoma, ki prenaša vsebino do

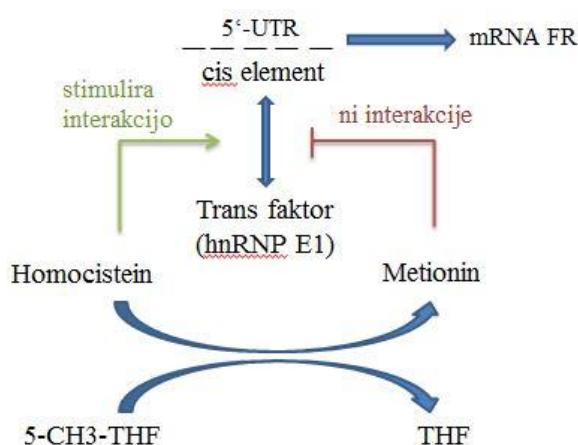
perinuklearnega kompartimenta, kjer se sprosti v citosol. V endosomu se ustvari rahlo kislo okolje, kar podpira teorijo, da pri tem zadnjem koraku delno sodeluje tudi PCFT (32).

### 1.1.9.2 Regulacija genov FR

*FR* geni so si podobni po velikosti in v kodirajočih eksonih, večje razlike pa obstajajo v regulatornih elementih in nekodirajočih regijah. Gena za  $FR\beta$  in  $FR\gamma$  sestojita iz petih eksonov in štirih intronov, medtem ko je gen  $FR\alpha$  iz sedmin eksonov in intronov (31).

Številne raziskave so pokazale, da se količina FR mRNA in samega proteina poveča, kadar nastopi pomanjkanje zunajceličnega folata, vendar pa biokemijski mehanizem te povezave ni povsem poznan (34, 35, 36). KB celična linija, ki so jo gojili pri znižani koncentraciji folatov (manj kot 10 nM), je povečala količino folatnega receptorja in FR mRNA za 3 - 5 krat (35). Pri rakavih celicah materničnega vratu, ki so jih gojili v rastnem mediju z le 9 nM folatom pa so opazili močno povečano izražanje FR, medtem ko je bila mRNA le minimalno povišana (34). To nakazuje, da je povečano izražanje FR lahko posledica sprememb v translacijskih ali posttranslacijskih mehanizmih.

Najnatančnejši mehanizem regulacije izražanja FR so na podlagi poskusov predlagali Antony in sodelavci. Kadar se količina 5-metilTHF znotrajcelično zniža, se inaktivira encim metionin sintaza in posledično zviša homocistein. Kopičenje homocisteina povzroči interakcijo med citosolnim transkripcijskim faktorjem heterogenim nuklearnim ribonukleoproteinom (hnRNP E1) in 18-baznim *cis*-elementom v 5'-neprevedljivi regiji  $FR\alpha$ , kar poveča količino mRNA FR (Slika 8) (34).



Slika 8 Mehanizem regulacije izražanja folatnih receptorjev

THF - tetrahidrofolat; 5-CH3-THF – 5-metiltetrahidrofolat; hnRNP E1 - heterogeni nuklearni ribonukleoprotein; 5'-UTR - 5'-neprevedljiva regija

### 1.1.10 Pomanjkanje folata

Pri pomanjkanju folatov pride do slabše sinteze nukleotidov, remetilacije homocisteina, sinteze metionina in tudi celičnih procesov metilacije. Vrednosti homocisteina se zvišajo, saj se ta ne more ponovno metilirati v metionin. Poleg tega se zniža koncentracija SAM, ki je največji donor metilnih skupin in se običajno sintetizira iz metionina. Njegovo pomanjkanje pa se kaže v pogostejših poškodbah in postopni hipometilaciji DNA molekule (37).

Teoretično bi morala povišana aktivnost encima DHFR poskrbeti za višjo vrednost THF, vsaj pri določenem odstotku celic, in delno kompenzirati znižane zaloge folata v rastnem mediju. Pri nižanju koncentracije folatov ali višanju koncentracije antifolatov v rastnem mediju, naj bi se torej povečala količina encima DHFR, s čimer celica poskuša ublažiti posledice pomanjkanja folatov ali inhibicije folatnega metabolizma (24). Celice, z močnim izražanjem folatnih receptorjev na svoji membrani, bi torej imele prednost preživetja pri selekcijskih pogojih.

### 1.1.11 Uporaba folne kislina kot selekcijski označevalc

Na kakšen način bi lahko torej folna kislina predstavljala nov selekcijski označevalc? Znižanje folne kislina v rastnem mediju bi lahko nadomestilo selekcijo z antibiotikom. Po transfekciji celične kulture z ekspresijskim vektorjem, ki bi vseboval gen za folatni receptor, bi transficiranim celicam omogočili rast pri selekcijskih pogojih. Običajno celicam zagotovimo visoko koncentracijo folne kislina v rastnem mediju, v tem primeru pa bi koncentracijo močno znižali in omogočili preživetje le celicam, ki so v lasten genom integrirale zunanji gen za FR. Pri takih pogojih bi bila celica primorana povečati raven izražanja gena za FR, saj bi si na ta način lahko izboljšala preskrbo s folati.

Testiran pristop selekcije produkcijske celične linije združuje oba selekcijska označevalca, ki sta vključena v folatni metabolizem (5). V tem primeru je prvi selekcijski označevalc membranski folatni prenašalec alfa ( $FR\alpha^*$ ), ki omogoča prenos folatov v celično notranjost, drugi pa je encim, pri katerem je folat njegov substrat (DHFR). Pomembno je vedeti, da vsaj delno vplivata drug na drugega. Encim DHFR naj bi deloval z večjo učinkovitostjo, če bi folatni prenašalec omogočil večje znotrajcelične količine folatov. Pričakovali bi, da bo povečano izražanje  $FR\alpha^*$  omogočilo večjim količinam folatov vstop v celico, kar bi takšnim celicam olajšalo preživetje v rastnem mediju z nižjo koncentracijo

folatov. Večja znotrajcelična koncentracija folatov pa bi pomenila tudi več substrata za encim DHFR in s tem višjo aktivnost encima. Aktivnost encima DHFR je torej odvisna tudi od aktivnosti folatnega prenašalca, prav tako je celična preživelost odvisna od stopnje izražanja  $FR\alpha^*$ . Rastni medij vsebuje tudi antifolat MTX, ki je inhibitor encima DHFR. Celice, ki močno izražajo encim DHFR lahko preživijo tudi višje koncentracije inhibitorja, še zlasti pri večji koncentraciji folatov znotrajcelično, kar pomeni, da je vsaj delno odvisna tudi od aktivnosti FR.

## 2 NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je testirati in ovrednotiti selekcijo produkcijske CHO celične linije v zgodnjem razvoju bioloških zdravil. Selekcija temelji na izražanju gena za mutirani folatni receptor  $\alpha$  (FR $\alpha^*$ ) in DHFR. V ekspresijskem vektorju je poleg seleksijskih genov tudi aminokislinsko zaporedje za lahko in težko verigo monoklonskega protitelesa. Osredotočili se bomo predvsem na celično linijo CHO-*Der5*.

Da bi ugotovili vpliv koncentracije folne kisline v rastnem mediju na celično viabilnost, bomo poskus pričeli z daljšim gojenjem parentalnih celic pri različnih koncentracijah folne kisline v rastnem mediju. Določili bomo mejne koncentracije folne kisline, ki celicam še omogočajo rast. Nato bomo celično linijo CHO-*Der5* transficirali z ekspresijskim vektorjem FR $\alpha^*/$ DHFR in jo gojili pri različnih seleksijskih pogojih. Izmerili bomo koncentracijo rekombinantnega monoklonskega protitelesa, s čimer bomo določili produktivnost zbirkov. Na tem koraku bomo nov seleksijski pristop primerjali z dosedanjim, pri katerem za selekcijo uporabimo geneticinski antibiotik in MTX. Parentalno celično linijo CHO-*Der5* bomo nato adaptirali na znižano koncentracijo folne kisline v rastnem mediju in ovrednotili vpliv adaptacije na regeneracijo po transfekciji in produktivnost zbirkov. S pomočjo metode qPCR bomo primerjali število kopij gena za FR $\alpha^*$  med posameznimi zbirkami.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Materiali

##### 3.1.1 Laboratorijska oprema

Aparature:

- analitska tehntica XP205 (Mettler Toledo)
- aparat za določanje števila in viabilnosti celic Vi-Cell XR (Beckman Coulter)
- aparat za merjenje koncentracije proteina Octet QK (Forte Bio)
- aparatura za elektroforezo E-Gel® iBase™ Power System (Life Technologies)
- avtoklav A-500/700 (Kambič)
- CO<sub>2</sub> inkubatorski stresalnik ISF1-X (Kühner)
- ekstraktor (Eppendorf)
- elektroporator Amaxa Nucleofector II (Lonza)
- hladilna omara MPR-721 (Sanyo)
- mikrobiološka komora MC15-2 (Iskra Pio)
- namizna centrifuga (Eppendorf)
- namizni mešalnik Vibromix 204EV (Tehnica)
- ozmomat Osmomat 030-D (Gonotec)
- pH meter 780 pH meter (Metrohm)
- pipete Eppendorf Reference 0,5 – 1000 ul (Eppendorf)
- pipetor Accu-Jet (Brand)
- pretočni citometer BD FacsCalibur (Becken Dickinson)
- robot za izolacijo nukleinskih kislin QiaCube (Qiagen)
- pipetirni robot PIRO® (Dornier)
- sistem za detekcijo in slikanje gelov Image Quant Las-4000 (GE Healthcare)
- spektrofotometer Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)
- talna tehntica GP-30KS (And)
- tehntica Exacta 1200 E (Tehnica)
- termomikser Thermomixer Comfort (Eppendorf)
- vodna kopel F34 (Julabo)
- zamrzovalna omara MDF-U730M (Sanyo)

Material:

- centrifugirke 15 ml in 50 ml (Corning Costar)
- filter sistemi za enkratno uporabo 0,22 $\mu$ m pore (Corning Costar)
- kolonice za homogenizacijo vzorca QIA Shredder (Qiagen)
- mikrocentrifugirke 2,0 ml, 1,5 ml in 0,5 ml (Eppendorf)
- mikrotitrtska ploščica s 96 vdolbinicami za merjenje titra (Forte bio)
- rastne plasenke 125 ml (Corning Costar)
- sterilne kapallke (Lonza)
- sterilne kivete (Lonza)
- sterilni nastavki za pipete s filtri (Eppendorf)
- stripete 5 ml, 10, ml, 25 ml in 50 ml (Corning Costar)

### 3.1.2 Kemikalije in reagenti

- biosenzorji za merjenje titra na Octet QK - Biosensor Protein A (Forte Bio)
- dimetil sulfoksid (Sigma)
- DNA lestvica - 100 bp in 1 kb (new England Biolabs)
- DNAza (Qiagen)
- ebetrexat (Ebewe Pharma)
- encim *SwaI* in 10x reakcijski pufer (Roche)
- etanol (Merck)
- folna kislina (Sigma-Aldrich)
- fosfatni pufer s soljo (Gibco)
- GFP vektor (Lonza)
- izopropanol (Merck)
- komplet za izolacijo nukleinskih kislin - QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)
- komplet za transfekcije - Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza)
- natrijev acetat (Sigma-Aldrich)
- nanašalni pufer - 6x DNA Loading Dye (Invitrogen)
- nukleaz prosta voda (Ambion)
- predpripravljen agarozni - gel E-gel 0,8% in 2% (Invitrogen)
- propidijev jodid (Sigma)

### 3.1.3 Celična kultura in rastni medij

Pri delu smo uporabili suspenzijsko kulturo ovarijskih celic samice kitajskega hrčka (CHO), natančneje štiri derivate celičnih linij CHO-*Der1*, CHO-*Der2*, CHO-*Der3* in CHO-*Der5*. Nekatere celične linije so bile podvržene genetskim modifikacijam, vse linije pa so bile adaptirane na enak rastni medij brez seruma.

Osnovni rastni medij smo pripravili po ustreznem postopku, preverili ustreznost pH in osmolalnosti in ga pred uporabo sterilno filtrirali (velikosti filter pore 0,22µm). Medij smo hranili pri 4°C, zaščitenega pred svetlobo, pred dodatkom k celicam pa smo ga segreli na 37°C.

Celične linije smo vzdrževali v osnovnem rastnem mediju (s folno kislino ali brez), obogatenemu z dodatki, v 125 ml rastnih plastenkah z delavnim volumnom 25 ml ali 250 ml rastnih plastenkah z delavnim volumnom 50 ml. Inkubirali smo jo v inkubatorskih stresalnikih pri nadzorovani atmosferi 37°C, 10 % CO<sub>2</sub> in 110 vrtljajev/min.

### 3.1.4 Ekspresijski vektor

Uporabili smo sintetiziran ekspresijski vektor, z vstavljenim genom za željen produkt in obema selekcijskima označevalcema (gena *FRα\** in *DHFR*). Ker je končni produkt rekombinantno monoklonsko protitelo, je v ekspresijski vektor vstavljena aminokislinska sekvenca za lahko in težko verigo. Poleg tega je pred vsako kodirajočo regijo še CMV promotor in za kodirajočo regijo SV40 poliadenilacijski signal.

Rezultate poskusa smo primerjali z rezultati rednega projekta, pri katerem smo uporabili standardni ekspresijski vektor. Ekspresijski vektor je vseboval identično aminokislinsko sekvenco za lahko in težko verigo monoklonskega protitelesa, vendar selekcijska označevalca neo in DHFR

### 3.1.5 Selekcija

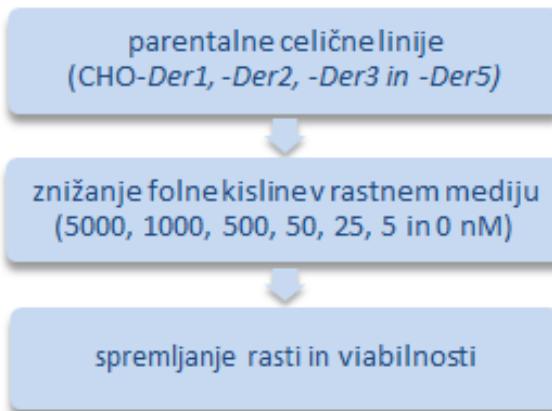
Za selekcijo smo uporabili raztopino folne kisline in metotreksata, ki smo ju v različnih količinah dodali osnovnemu rastnemu mediju brez folne kisline. Pripravili smo raztopini z ustrezeno koncentracijo in ju sterilno filtrirali (filter pora 0,22 µm). Folno kislino smo raztopili v mediju brez folne kisline, metotreksat pa v PBS. Raztopini smo hranili pri 4°C, folno kislino smo zaščitili pred svetlobo.

### 3.2 Načrt poskusov

Cilj je bil pripraviti transficirano celično linijo za produkcijo rekombinantnega monoklonskega protitelesa z uporabo novega selekcijskega označevalca ( $FR\alpha^*$ ) v kombinaciji z dosedanjim (DHFR). Pričeli smo s testiranjem različnih koncentracij folne kisline v rastnem mediju pri štirih parentalnih celičnih linijah. Z dobljenimi rezultati smo načrtovali nadaljevanje poskusa (tokrat le za celično linijo CHO-Der5), kjer smo testirali različne kombinacije koncentracij folne kisline in MTX v rastnem mediju po transfekciji z ustreznim ekspresijskim vektorjem. Po končani selekciji smo zbirke nacepili na dohranjevalno šaržo in zadnji dan šarže izmerili produktivnost (titer). V tem koraku smo rezultate primerjali z rednim projektom, kjer je produkt enako monoklonsko protitelo, selekcija pa je potekala po ustaljenem protokolu. Na podlagi produktivnosti smo se odločili za najustreznejši koncentraciji folne kisline in MTX za selekcijo transficirane celične linije CHO-Der5 in poskus ponovili, tokrat tudi s predhodno adaptacijo parentalnih celic na znižano koncentracijo folne kisline v rastnem mediju. Zanimalo nas je tudi število kopij gena  $FR\alpha^*$  med posameznimi zbirki po selekciji, kar smo določali z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR).

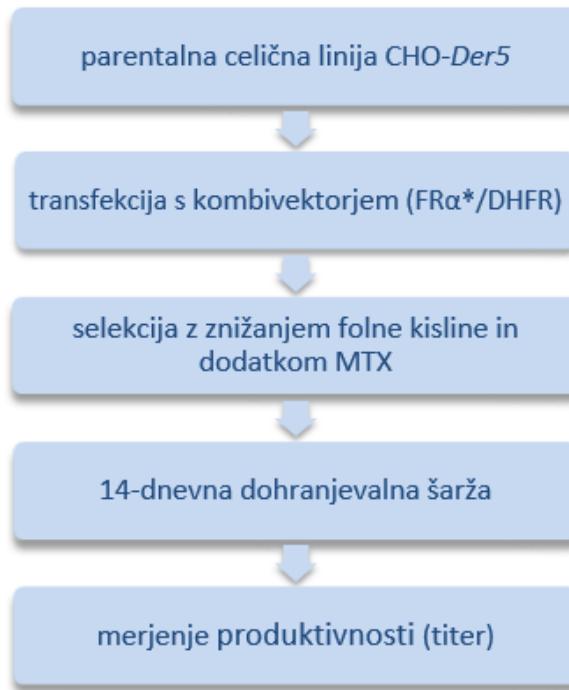
Za boljšo preglednost so spodaj prikazane sheme poskusov.

#### 3.2.1 **Poskus I Testiranje vpliva znižane folne kisline v rastnem mediju pri netransficiranih celičnih linijah**



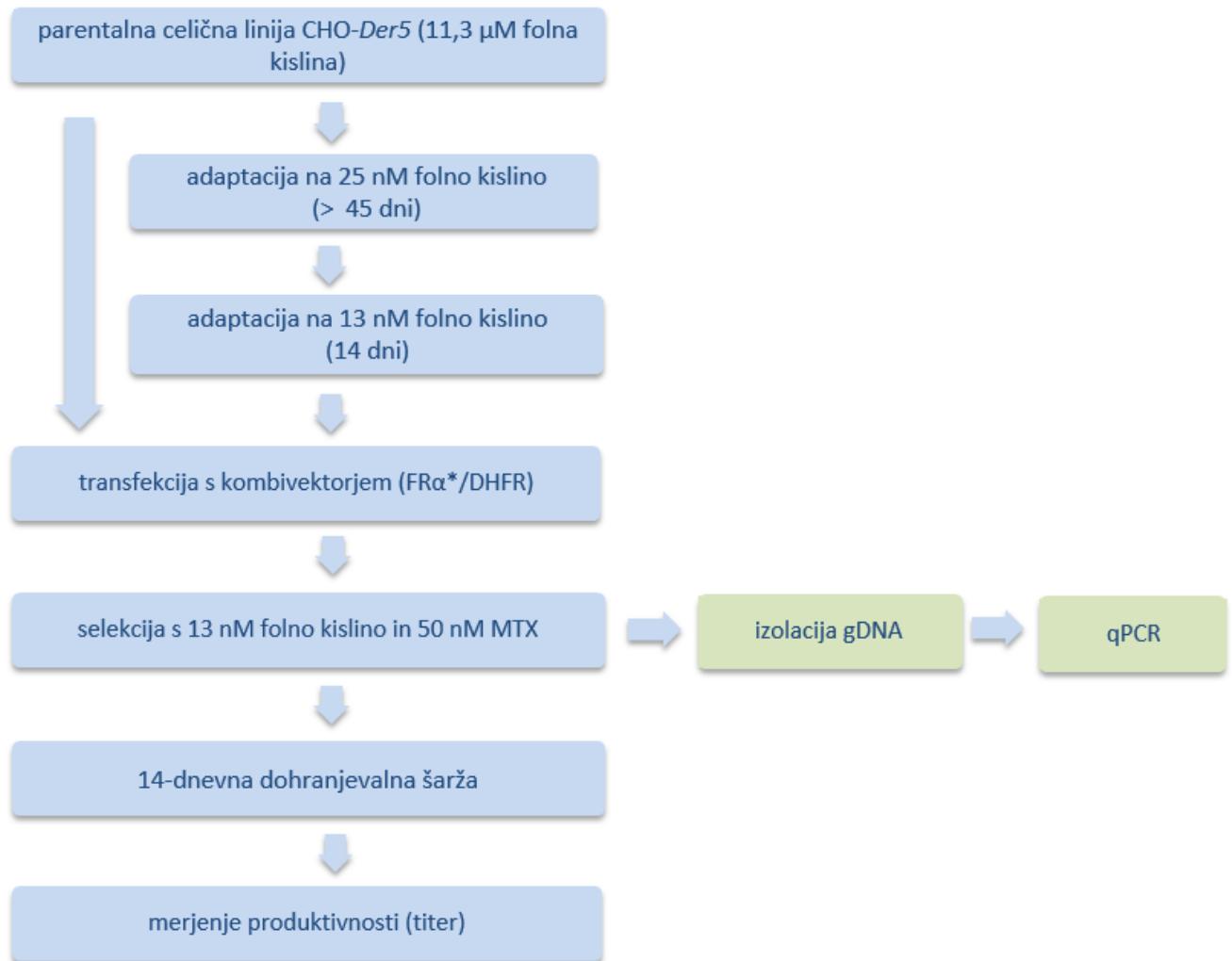
**Slika 9** Potek Poskusa I

3.2.2 **Poskus II Testiranje vpliva kombinacije folne kisline in metotreksata v rastnem mediju pri transficirani celični liniji CHO-Der5**



**Slika 10** Potek Poskusa II

### 3.2.3 *Poskus III Adaptacija CHO-Der5 celične linije na znižano koncentracijo folne kisline pred transfekcijo*



**Slika 11** Potek Poskusa III

### 3.3 Metode

#### 3.3.1 Odmrzovanje celične kulture

Krioviale smo odmrznili s pomočjo *Eppendorf Thermomixer* ( $37^{\circ}\text{C}$ , 400 vrtljajev/min, 4 min). Ko se je vsebina krioviale vidno odtalila, smo jo s sterilno pipeto aseptično prenesli v rastno plastenko, s predhodno ogretim rastnim medijem ( $V=50 \text{ ml}$ ). Sveže odtaljeno celično kulturo smo vzorčili na *Vi-CELL* aparaturi in izmerili njeno gostoto in odstotek viabilnih celic. Po potrebi smo celično kulturo pasirali na koncentracijo  $2 \times 10^5 \text{ celic/ml}$ . Kulturo smo inkubirali pri  $37^{\circ}\text{C}$ , 10%  $\text{CO}_2$  in 110 vrtljajev/min v stresnem inkubatorju.

#### 3.3.2 Vzorčenje celične kulture na aparatu *Vi-CELL*

V mikrobiološki komori smo s sterilno pipeto aseptično odvzeli vzorec celične kulture v ustrezni vsebnik za enkratno uporabo. Vsebnik z vzorcem smo ročno vstavili na ustrezno mesto v aparatu, nato aparat avtomatsko prične z analizo vzorca celične kulture. Aparat najprej vsrka vzorec z aspiracijsko iglo, ga zmeša z barvilo *Trypan Blue* in dostavi v vzorčno komoro, kjer z vstavljenem digitalno kamero posname določeno število posnetkov. Barvilo *Trypan blue* vstopa le v celice s poškodovano membrano, žive celice torej ostanejo neobarvane.

Na podlagi posnetkov s pomočjo različnih algoritmov računalniški program določi gostoto živih celic (št. celic/ml) in odstotek viabilnih celic (%) v vzorcu celične kulture.

#### 3.3.3 Kultivacija celične kulture

Celično kulturo smo najprej vzorčili in ugotovili njeno koncentracijo s pomočjo aparata za štetje celic *Vi-CELL*. Nato smo iz znane koncentracije živih celic/ml izračunali volumen kulture, ki smo ga žeeli ohraniti in mu dodali ustrezni volumen rastnega medija. Celično kulturo smo precepljali 2 – 3 krat tedensko.

Količino volumna kulture smo izračunali po Formuli 1:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Formula 1:  $C_1$  – koncentracija celične kulture (št. viab. celic/ml),  $V_1$  – volumen celične kulture (ml),  $C_2$  – končna koncentracija celic v suspenziji (št. viab. celic/ml),  $V_2$  – končni volumen celične kulture (ml)

Končni volumen je odvisen od velikosti rastne plastenke.

### 3.3.4 Zamrzovanje celične kulture

Celična kultura mora biti pred zamrzovanjem dobro rastoča, z viabilnostjo nad 90%.

Za zamrzovanje ene krioviale smo  $6 \times 10^6$  celic centrifugirali 5 min pri  $180 \times g$  in sobni temperaturi. Po centrifugiranju smo odstranili ves supernatant razen 1 ml. Dodali smo 7,5% DMSO in celice nežno resuspendirali. S pomočjo pipete smo celično kulturo razporedili v ustrezno označene krioviale in zamrznili pri  $>-70^{\circ}\text{C}$ . Po 24h smo krioviale prenesli v krioposodo s tekočim dušikom.

### 3.3.5 Linearizacija ekspresijskega vektorja

Pred transfekcijo parentalnih celic smo ekspresijski vektor (pDNA) linearizirali z restrikcijsko endonukleazo *SwaI*, ki prepozna specifično nukleotidno zaporedje ATTT $\downarrow$ AAAT in generira tope konce. S tem vektorju omogočimo lažjo integracijo v celično genomsko DNA, kar poveča učinkovitost transfekcije.

Delo je potekalo aseptično v mikrobiološki komori, ki smo jo predhodno sterilizirali z UV lučjo. V sterilno mikrocentrifugirko smo zmešali vodo, vektor, pufer in ustrezen encim. Tako pripravljeno restrikcijsko mešanico smo premešali in inkubirali 3h v vodni kopeli pri  $25^{\circ}\text{C}$ .

#### **Preglednica I** Restrikcijska mešanica za linearizacijo ekspresijskega vektorja

Komponenta	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]
pDNA	67
pufer	40
encim	20
voda	273
skupni volumen	400

Po inkubaciji smo pDNA očistili tako, da smo restrikcijski mešanici dodali enak volumen ledeno hladnega in sterilno filtriranega izopropanola ter premešali na namiznem mešalniku, dokler nismo s prostim očesom videli oborjene pDNA. Mikrocentrifugirko smo nato centrifugirali 30 min pri  $21000 \times g$  in  $4^{\circ}\text{C}$ , zavrgli supernatant in dodali enak volumen ledeno hladnega sterilno filtriranega 70 % etanola. Ponovno smo centrifugirali 1 min pri  $21000 \times g$  in  $4^{\circ}\text{C}$ , zavrgli supernatant in celični pelet posušili na pretoku zraka v mikrobiološki komori (30 - 60 min). Pelet smo čez noč inkubirali v  $50 \mu\text{l}$  sterilne vode pri

temperaturi 2 - 8°C, naslednji dan pa na spektrofotometru *Nanodrop* izmerili koncentracijo in čistost pDNA.

### 3.3.6 Elektroforeza nukleinskih kislin na agaroznem gelu

Z elektroforezo na agaroznem gelu smo preverili uspešnost rezanja ekspresijskega vektorja z restriktijskimi endonukleazami. Za elektroforezo smo uporabili predpripravljen 0,8% agarozni gel (*E-Gel, Invitrogen*), ki v gelu že vsebuje etidijev bromid.

Vzorce smo pripravili za nanos na gel tako, da smo 500 ng ekspresijskega vektorja (pDNA) dodali sterilno vodo in nanašalni pufer (1x). Nanašalno mešanico smo premešali in jo nanesli v luknjice na E-Gelu, poleg tega smo nanesli tudi nelineariziran ekspresijski vektor in DNA označevalec velikosti (1kb). Elektroforeza je potekala 30 min pri standardni napetosti v zatemnjenem prostoru.

Po končani elektroforezi smo agarozni gel slikali na aparatu za detekcijo elektroforeznih gelov (*LAS-4000*), ki deluje na principu obsevanja gelov z UV-žarki. Iz zajete slike smo lahko razbrali, da je bil ekspresijski vektor uspešno lineariziran in ga lahko uporabimo za transfekcije.

### 3.3.7 Transfekcije

Lineariziran vektor smo v parentalne celice vnesli s pomočjo nukleofektorja *Amaxa Nucleofector 2b device*, ki deluje na principu elektroporacije.

Na dan transfekcij smo določili viabilnost in gostoto celic z uporabo aparata *Vi-CELL*. Celična kultura mora biti pred transfekcijo dobro rastoča, z viabilnostjo nad 90 %. Za eno transfekcijo smo v centrifugirko prenesli  $5 \times 10^6$  celic, po centrifugiranju (5 min, 180 x g, sobna temperatura) smo odstranili supernatant, celičnemu peletu pa dodali 90 µl nukleofekcijske raztopine in 3 µg lineariziranega vektorja. Tekočino smo prenesli v sterilno nukleofekcijsko kiveto in sprožili postopek nukleofekcije. Po nukleofekciji smo transficirane celice prenesli v 125 ml stresalno plastenko s 15 ml ogretega rastnim medijem in jih inkubirali pri standardnih pogojih (37°C, 10 % CO<sub>2</sub> in 110 vrtljajev/min). Celoten postopek je potekal pri aseptičnih pogojih.

Na enak način smo pripravili tudi pozitivno in negativno kontrolo, le da smo celice pri pozitivni kontroli transficirali z GFP vektorjem, celice pri negativni pa izpostavili enakim pogojem transfekcije, vendar brez uporabe vektorja (Preglednica II)

### Preglednica II Transfekcije CHO-Der5 celične linije

	Celična linija	Št. celic	Ekspresijski vektor
<b>Zbirki</b>	CHO-Der5	$5 \times 10^6$	pDNA (FRα <sup>*</sup> /DHFR)
<b>Kontrola +</b>	CHO-Der5	$5 \times 10^6$	GFP
<b>Kontrola -</b>	CHO-Der5	$5 \times 10^6$	/

#### 3.3.8 Preverjanje uspešnosti transfekcij s pretočnim citometrom *BD FACScalibur*

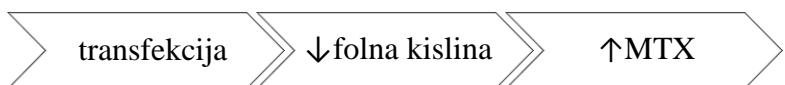
Na pretočnem citometru smo pomerili pozitivni in negativni kontrolni vzorec 24 h po transfekcijah. Celično kulturo smo vzorčili na aparatu za štetje celic *Vi-CELL* in centrifugirali  $1 \times 10^6$  celokupnih celic. Celice smo spirali v 3 ml fosfatnega pufra s soljo (PBS), centrifugirali (5 min, 300 x g, sobna temperatura), pelet celic resuspendirali v 300 µl PBS in vzorec zaščitili pred svetlobo. Pred analizo smo vzorcu dodali 10 ng/µl propidijevega jodida, vsebino premešali na namiznem mešalniku in na pretočnem citometru pomerili fluorescenco. Iz dobljenih rezultatov smo razbrali dva parametra - odstotek preživelih celic in odstotek transficiranih celic od vseh preživelih celic.

#### 3.3.9 Selekcija

##### Selekcija s folno kislino in metotreksatom (testirani protokol)

Uporabili smo dva pristopa selekcije:

1) Pred transfekcijo smo celice kultivirali v rastnem mediju z običajno koncentracijo folne kisline ( $11,3 \mu\text{M}$ ), takoj po transfekciji pa smo jih iz nukleofekcijske kivete prenesli v rastni medij z znižano koncentracijo folne kisline. Po nekaj dneh (približno en teden), ko se je viabilnost in gostota celic izboljšala ( $>70\%$  viabilnost), smo celicam v rastni medij dodali antifolat metotreksat (MTX).

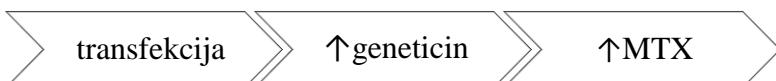


2) Pred transfekcijo smo parentalne celice vsaj 14 dni kultivirali v rastnem mediju z znižano koncentracijo folne kisline (adaptacija), nato smo jih transficirali. Po nekaj dneh (približno en teden), ko se je viabilnost in gostota celic izboljšala, smo celicam v rastni medij dodali antifolat metotreksat (MTX).



### **Selekcija z geneticinom in metotreksatom (standardni protokol)**

Rezultate poskusa smo primerjali z rezultati rednega projekta, ki je potekal po standardnemu protokolu. Ker smo celice transficirali z ekspresijskim vektorjem neo/DHFR, smo za selekcijo po transfekciji uporabili geneticinski antibiotik v kombinaciji z metotreksatom. Gen *neo* namreč omogoča uspešno transficiranim celicam rezistenco na antibiotik.



#### **3.3.10 Spremljanje celične produktivnosti**

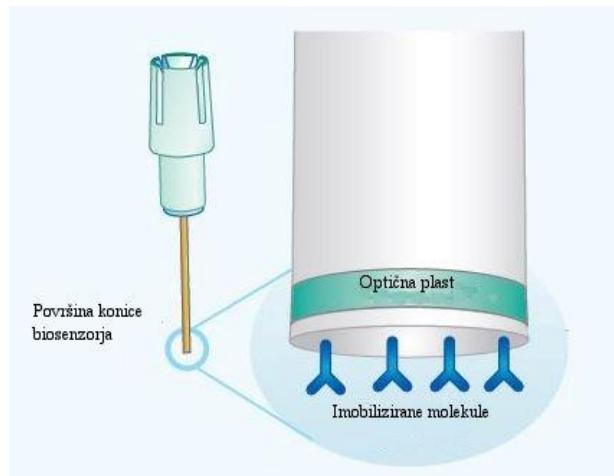
Po selekciji smo zbirke nacepili na 14-dnevno šaržo z dohranjevanjem ( $4 \times 10^5$  celic, V= 60 ml). Viabilnost zbirkov ob nacepitvi je bila višja od 90 %. Vsem zbirkom smo tekom 14-dnevnega gojenja dodajali hranila. Vsi zbirki so bili podvrženi spremembji temperature gojenja na dan 7. Med gojenjem smo spremljali gostoto, viabilnost in produktivnost celične kulture (Preglednica III).

**Preglednica III** Shema vzorčenja zbirkov med 14-dnevno šaržo z dohranjevanjem

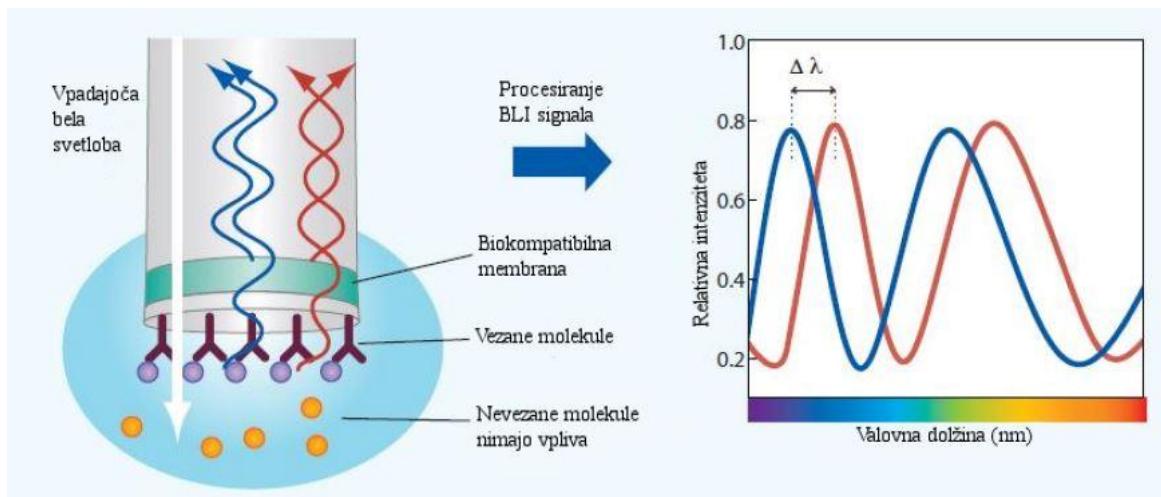
Dan	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Gostota				X			X			X		X		X
Viabilnost				X			X			X		X		X
Titer							X			X				X

### 3.3.11 Merjenje produktivnosti na aparatu *Octet QK*

Kvantifikacijo končnega produkta (mAB) smo določili na analizatorju *Octet QK*, ki uporablja metodo Bio-Layer Interferometry. Za meritev uporablja biosenzorje, ki imajo na površini imobiliziran protein A, ki veže producirano monoklonsko protitelo (Slika 12). Analizator pošilja belo svetlobo vzdolž biosenzorja in zbira svetlobo, ki se odbija nazaj. Valovna dolžina reflektirane svetlobe je odvisna od debeline nanosa na površini optične plasti. Nekatere valovne dolžine kažejo konstruktivno druge destruktivno interferenco, kar zazna spektrofotometer. Vsakič, ko se na površino veže večje število molekul, se interferenčni vzorec spremeni in to spremembo spektrofotometer spremi v realnem času (Slika 13). Sprememba valovne dolžine je neposredna posledica spremembe v optični debelini nanosa (nm) na površini biosenzorja. Za merjenje so primerni tako sveži vzorci celične kulture, kot supernatant ali kromatografsko očiščeni vzorci (38).



Slika 12 Konica biosenzorja



**Slika 13** Princip merjenja produktivnosti na aparatu *Octet QK*

Za določitev koncentracije produkta (mAB) v vzorcu celične kulture smo pripravili po 200 µl vzorca sveže kulture v ustreznou ploščico s 96 vdolbinami. V drugo ploščico s 96 vdolbinami pa 200 µl rastnega medija in vanj potopili biosenzorje. S pomočjo umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili iz različnih redčin vzorca enakega monoklonskega protitelesa, analizator izračuna koncentracijo produkta v vzorcu celične kulture.

### 3.3.12 Priprava celičnih peletov

Za izolacijo genomske DNA (gDNA) smo pripravili celične pelete zbirkov po selekciji. V centrifugirko smo odvzeli  $2 \times 10^7$  celic in centrifugirali (10 min, 4°C in 1500 x g). Celice smo imeli med delom ves čas na ledu. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in pelet sprali s ponovnim centrifugiranjem v ohlajenem PBS. Po centrifugiranju smo previdno odstranili supernatant in pelet celic shranili pri temperaturi manj kot -60°C.

### 3.3.13 Izolacija nukleinskih kislin na aparatu *QIAcube*

#### 3.3.13.1 Izolacija genomske DNA

Genomsko DNA smo izolirali s pomočjo aparata *QIAcube*, ki avtomatsko izolira gDNA, pDNA, RNA, virusne nukleinske kisline ali proteine. Za izolacijo gDNA smo uporabili  $5 \times 10^6$  celic, spranih s PBS in reagenčni komplet *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen). Delovali smo po navodilih proizvajalca.

Celoten proces izolacije je avtomatiziran, potrebna je le predpriprava potrebnih reagentov, pufrov in vzorcev. Pri izolaciji gDNA po zagonu robot prične z lizo celic, nato vzorci

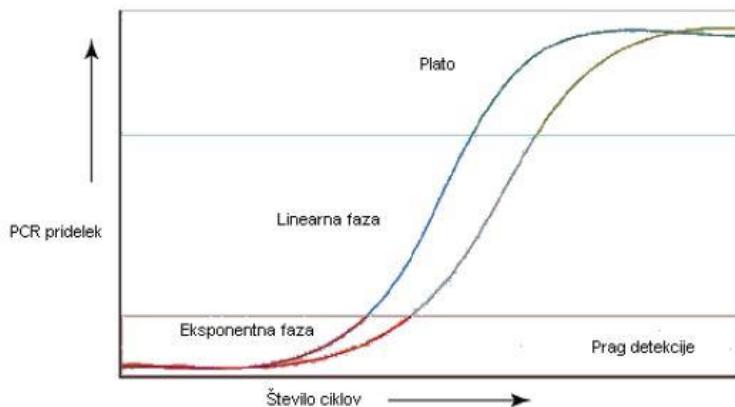
prehajajo čez kolone, kamor se vežeta DNA in RNA, ostale nečistoče se na membrano kolone ne vežejo. Kolona je nato tretirana z RNAAzo, s čimer odstranimo RNA, gDNA pa se na koncu eluira v mikrocentrifugirke. Po izolaciji smo izoliranim vzorcem izmerili koncentracijo na spektrofotometru *Nanodrop ND-1000*, kjer smo iz razmerij 280/260 nm in 230/260 nm preverili tudi čistost gDNA. Vzorce gDNA smo nato oborili z uporabo natrijevega acetata in poobarjanju ponovno izmerili koncentracijo na spektrofotometru *Nanodrop ND-1000*. Vzorce smo do uporabe shranili pri -80 °C.

### 3.3.14 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)

Klasična verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda za encimsko pomnoževanje specifičnih odsekov DNA. PCR v realnem času (qPCR) pa je različica klasičnega PCR, ki omogoča spremljjanje nastajanja pomnožkov med samim procesom pomnoževanja. Za PCR reakcijo potrebujemo matrično DNA verigo, oligonukleotidne začetnike (s katerimi omejimo odsek pomnoževanja), deoksiribonukleozid-trifosfate in DNA polimerazo. Veriga se podaljšuje v smeri 5'→3', nastala DNA pa nato služi kot matrica za nadaljnje pomnoževanje. (39, 40).

Ločimo tri faze, ki se tekom pomnoževanja ponavljajo: 1) denaturacija dvojne matrične vijačnice pri 94 - 95 °C 2) prileganje oligonukleotidnih začetnikov na specifično zaporedje na enovijačni DNA pri 30 - 70 °C 3) podaljševanje novonastale verige s pomočjo DNA polimeraze pri 72 °C, ki dodaja nukleotide. (39, 40).

Teoretično se število produkta z vsakim cikлом podvoji, v realnosti pa pomnoževanje po nekaj časa doseže plato in iz količine produkta ni več mogoče sklepati na začetno število kopij (Slika 11). Klasični PCR, kjer zaznavanje poteka po koncu pomnoževanja, torej ni primeren za kvantifikacijo. PCR v realnem času pa nam omogoča, da spremljamo produkt v vsakem ciklu, kar dosežemo z fluorescentnim označevanjem oligonukleotidnih začetnikov, pomnožkov ali sond. Z vsakim pomnožkom se spremeni intenziteta signala in to sorazmerno s količino produkta. Rezultat je amplifikacijska krivulja, kjer je prikazana odvisnost jakosti fluorescence od števila ciklov (39, 41).



**Slika 14** Krivulja pomnoževanja pri qPCR

Pri qPCR poznamo različne načine označevanja DNA produkta. Mi smo uporabili eno izmed najbolj pogostih, ki temelji na uporabi specifičnih začetnih oligonukleotidov – metoda *TaqMan*. Sonda *TaqMan* sestoji iz kratkega oligonukleotida s specifičnim zaporedjem, ki je na obeh koncih označen z različnima fluorescenčnima barvilo. Barvilo vezano na 3' koncu ima vlogo dušilca, barvilo na 5' koncu pa vlogo reporterja. Dokler je sonda v intaktnem stanju, torej sta obe barvili v neposredni bližini, dušilec absorbira sproščeno svetlobo reporterske molekule in sonda ne fluorescira. Med podaljševanjem DNA verige s Taq-polimerazo (5' - 3') pa pride do hidrolize sonde, dušilec in reporter se fizično ločita. Ko dušilec ne absorbira več svetlobe reporterske molekule, prične sonda fluorescirati. Tekom reakcije se koncentracija fluorescentnega barvila povečuje, kar pa je sorazmerno količini pomnožka (39, 42).

### 3.3.15 Preverjanje števila kopij gena *FRα\** z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR)

Z metodo qPCR smo preverili ali se je število kopij gena za folatni receptor (*FRα\**) med posameznimi zbirki pri *Poskusu III* razlikovalo. Pripravili smo dve standardni krivulji. Za prvo standardno krivuljo smo uporabili redčine standarda (eksprejskega vektorja, s katerim smo transficirali celice). Iz krivulje smo nato določili število kopij *FRα\** v vzorcih. Poleg tega je pomembna izbira primernega referenčnega gena za normalizacijo ravni izražanja preučevanega gena. Za ta namen smo pripravili še drugo standardno krivuljo, za katero smo uporabili izolirano gDNA parentalne celične linije CHO-*Der1*, iz krivulje pa nato določili število kopij endogenega gena *GLUC*. Število kopij *FRα\** v vzorcu smo nato

delili s številom kopij endogenega gena v vzrocu *CHO-Der1* in dobili število kopij amplikonov na haploidni genom celice.

### 3.3.15.1 Izvedba

Določitev števila kopij smo določali na ABI Prism®7900HT Sequence detection system (*Applied Biosystems*) in reakcijskih ploščicah s 384 vdolbinicami (*ABI Prism*). Uporabili smo reagenčni komplet *TaqMan® Universal Master Mix* (*Applied Biosystems*) in dva seta začetnih oligonukleotidov (Preglednica IV) s sondama. Prvi set je bil namenjen zaznavi endogenega gena *GLUC* (kot referenčni gen). Drugi set je bil sintetiziran tako, da se veže zgolj na mutirani *FRα* (*FRα\**), ki je bil vnešen v ekspresijski vektor in ne na endogeni *FRα*.

#### Preglednica IV Uporabljeni seti začetnih oligonukleotidov

Amplikon	Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje
<i>GLUC</i> (referenčni gen)	5'zač. oligonukleotid	ATTGCCAACGCCACGAT
	3'zač. oligonukleotid	CCAAGCAATGAATTCCCTTGC
	Sonda	CTGAAGGGACCTTACCA
<i>FRα*</i> (analizirani gen)	5'zač. oligonukleotid	CACAAGGACGTCAGCTATCTGTACA
	3'zač. oligonukleotid	TGGATGAAGTGCCCTTGCA
	Sonda	TTCAACTGGAACCCTGCGCGA

Da bi se izognili morebitnim navzkrižnim kontaminacijam, smo reakcijske mešanice pripravljali v laminarju, vzorce pa v mikrobiološki komori. Med delom smo delovno površino in orodje čistili s 70 % izopropanolom. Reakcija je potekala pri standardnih pogojih (Preglednica V).

#### Preglednica V Pogoji pomnoževanja na qPCR

začetni koraki	pomnoževanje (40 ciklov)		
aktivacija nukleaze UNG	aktivacija AmpliTaq Gold DNA-polimeraze	denaturacija	prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje
2 min 50 °C	10 min 95 °C	15 s 95 °C	1 min 60 °C

Izolirano gDNA vzorcev smo s pomočjo pipetirnega robota *PIRO®* nanesli na reakcijsko ploščico (sestava reakcijskih mešanic je prikazana v Preglednici VI) in sicer v petih redčinah, vsak vzorec v treh paralelah. Pripravili smo tudi negativno kontrolno reakcijo,

kjer smo v reakcijsko mešanico namesto vzorca nanesli prečiščeno vodo. Negativna kontrola je služila kontroli kontaminacije med delom.

### Preglednica VI Sestava reakcijske mešanice

Komponenta	Volumen [μl]
Taq Man Master Mix	5,0
test (zač. oligonukleotidi + sonda)	2,0
vzorec	3,0
skupni volumen	10,0

Glede na izhodno koncentracijo referenčnih vzorcev smo izračunali število kopij endogenega gena (število kopij *GLUC* gena v *CHO-DerI*) v različnih razredčinah ( $10\times$ ,  $50\times$ ,  $100\times$ ,  $500\times$ ,  $1000\times$ ) ter generirali standardno krivuljo. Število kopij vzorca v reakciji za standardno krivuljo smo izračunali po Formuli 2. Standardna krivulja je narejena tako, da so na x-osi logaritemske ( $\log_{10}$ ) vrednosti števila kopij v reakciji in na y-osi pripadajoče Cq vrednosti. Linearna korelacija med obema parametroma, ki jo predstavlja premica in enačba premice se uporabi za izračun števila kopij tarčne sekvene v preiskovanem vzorcu. Po Formuli 3 smo izračunali tudi učinkovitost pomnoževanja in določili korelacijski faktor ( $R^2$ ).

dolžina genoma kitajskega hrčka (*Cricetulus griseus*)= $3.55 \times 10^9$  bp  
 1 bp=618 g/mol  
 $M(1\text{ kopija genoma}) = 3.55 \times 10^9 \text{ bp} * 618 \text{ g/mol/bp} = 2.194 \times 10^{12} \text{ g/mol}$   
 $M(1\text{ kopija genoma}) = 1/N_A * M(1\text{ kopija genoma}) = (1/6.023 \times 10^{23}/\text{mol}) * 2.194 \times 10^{12} \text{ g/mol} = 3.64 \times 10^{-12} \text{ g} = 3.64 \text{ pg}$   
 Tako ima vsaka diploidna celica hrčka  $2 \times 3.64 \text{ pg DNA}$ .

Formula 2: Primer izračuna števila kopij za pripravo standardne krivulje.

$$E = 10^{\frac{I/k}{2}} - 1$$

Formula 3: Učinkovitost pomnoževanja.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

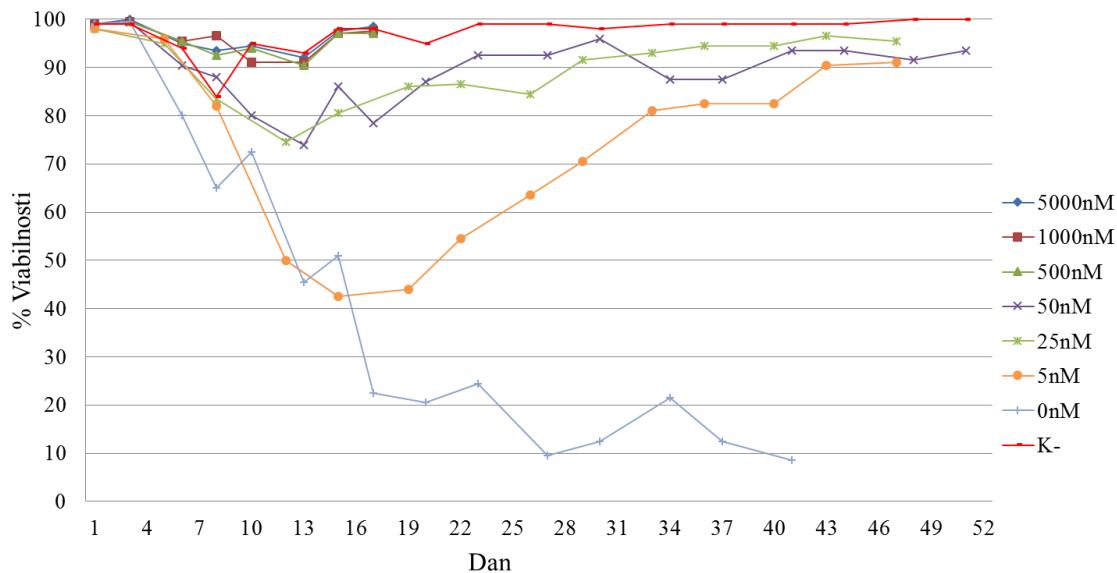
### 4.1 Poskus I

#### 4.1.1 Vpliv znižane koncentracije folne kisline v rastnem mediju na viabilnost celic pri parentalnih celičnih linijah CHO-Der1, -Der2, -Der3 in -Der5

Da bi ugotovili vpliv znižane koncentracije folne kisline na viabilnost populacije parentalnih celičnih linij CHO-Der1, -Der2, -Der3 in -Der5 ter določili okvirno koncentracijo folne kisline, ki omenjenim celičnim linijam še omogoča preživetje, smo celice dlje časa gojili pri znižani koncentraciji folne kisline v rastnem mediju. S centrifugiranjem smo odstranili običajni rastni medij in celice v dveh bioloških ponovitvah nacepili v rastni medij s 5000, 1000, 500, 50, 25 ali 5 nM folno kislino. Kot negativno kontrolo (K-) smo celice vzporedno gojili v rastnem mediju z običajno koncentracijo folne kisline (11,3 µM). Poleg tega smo vse štiri parentalne celične linije nacepili tudi v rastni medij brez folne kisline (0 nM), da bi ugotovili, na kakšen način in kako hitro se celice odzovejo na popolno odsotnost folatov. Celice smo precepljali 2 – 3 krat tedensko in jih vsakokrat pred precepljanjem vzorčili na aparatu za štetje celic *Vi-Cell*. Rast in viabilnost celic smo spremljali v obdobju dveh do sedmih tednov, rezultati so prikazani na spodnjih grafih (Graf 1-4).

Pri celični liniji CHO-Der1 smo pri koncentraciji 50, 25, 5 in 0 nM v prvih nekaj dneh opazili postopen padec viabilnosti, medtem ko je viabilnost celic pri 5000, 1000 in 500 nM folni kislini ves čas presegala 90 % (Graf 1). Viabilnost celic negativne kontrole je bila ves čas nad 90 %, z izjemo četrte pasaže, kjer je viabilnost rahlo padla, kar pa je lahko zgolj posledica na primer uporabe prehladnega rastnega medija. Po 12 dneh smo opazili postopno izboljšanje viabilnosti celic pri 25 in 50 nM folni kislini, po enem mesecu pa se je gibala okoli 90 %. Pri celicah, ki smo jih gojili v mediju brez folne kisline, smo po pričakovanjih opazili hiter padec viabilnosti, ki se tudi po daljšem časovnem obdobju ni izboljšala. Hiter padec viabilnosti smo po prvih dveh tednih pasaž zaznali prav tako pri 5 nM folni kislini, vendar pa smo po daljšem gojenju opazili postopno adaptacijo in izboljšanje viabilnosti do 90 %. Pri krajšem času gojenja bi hitro lahko zaključili, da 5 nM folna kislina ne zadostuje za preživetje parentalne celične linije CHO-Der1, zato je pomembno, da rezultate spremljamo skozi daljši čas, saj so spremembe opazne postopoma.

Rezultati so pokazali, da netransflicirana celična linija CHO-Der1 lahko preživi pri 5 nM folni kislini, vendar pa sta rast in proliferacija močno upočasnjeni.

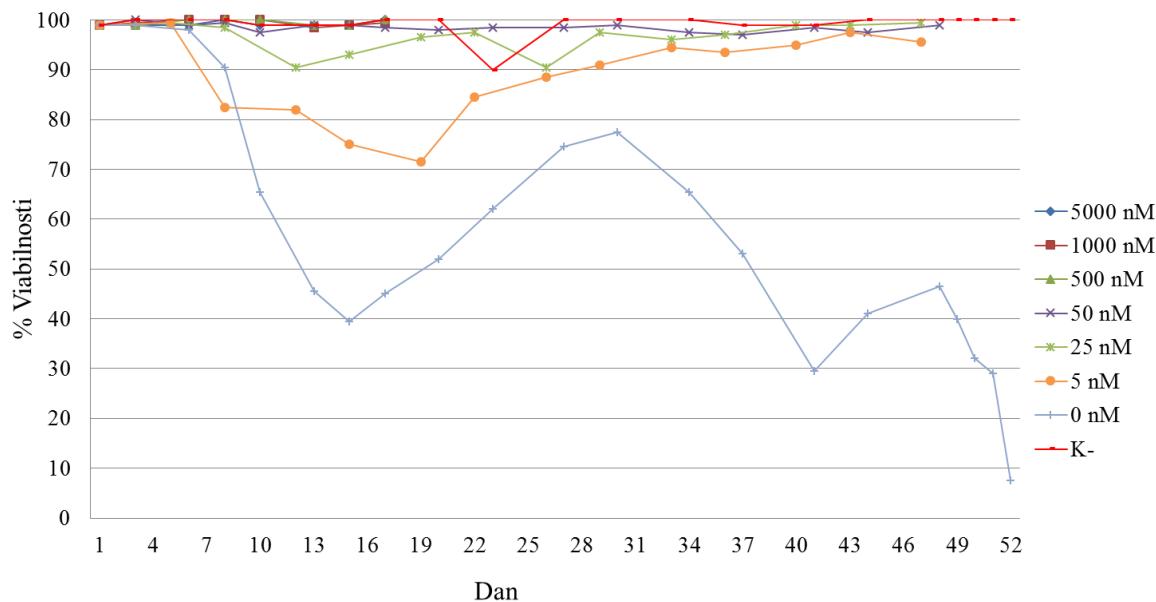


**Graf 1** Povprečje viabilnosti parentalne celične linije CHO-Der1 pri znižani koncentraciji folne kisline

Celice smo gojili pri različnih koncentracijah folne kisline v rastnem mediju. Za negativno kontrolo (K-) smo celice gojili v običajnem rastnem mediju, z 11,3 µM folno kisline

Podobne rezultate smo opazili pri parentalni celični liniji CHO-Der2 (Graf 2), vendar padec viabilnosti ni bil tako izrazit. Pri koncentracijah folne kisline višjih od 50 nM je bila viabilnost konstantna, rahlo nihanje smo opazili pri koncentraciji 25 nM. Izrazitejši padec viabilnosti smo zaznali pri 5 nM folni kislini, vendar občutno manjši, kot pri parentalni celični liniji CHO-Der1. Kljub temu si je celična kultura po štirih tednih gojenja opomogla in viabilnost pri 5 nM folni kislini se je dvignila nad 90 %. Do zanimivih rezultatov smo prišli pri celicah, ki smo jih gojili v odsotnosti folne kisline. Po prvem tednu je sledil hiter padec viabilnosti, vendar se je po 14 dneh trend spremenil in celična kultura si je po mesecu dni opomogla do viabilnosti višji od 70 %. Kmalu za tem je sledil ponovem padec viabilnosti. Kulturo smo poskušali vzdrževati čim dlje, vendar je po sedmih tednih gojenja odmrla. Predvidevamo, da je v vmesnem obdobju rasti prišlo do spremembe v metabolizmu folne kisline ali notranjih zalog, kar je celični kulturi začasno omogočalo preživetje tudi ob odsotnosti folatov v rastnem mediju. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi drugi; James in sodelavci so pri gojenju celične linije CHO-AA8 in CHO-UV5 ob

pomanjkanju folatov (1 nM) ugotovili, da se je rast po štirih dneh gojenja močno upočasnila, delež mrtvih celic hitro zvišal, manjša subpopulacija rezistentnih celic pa se je vseeno uspela adaptirati na nove pogoje (43).

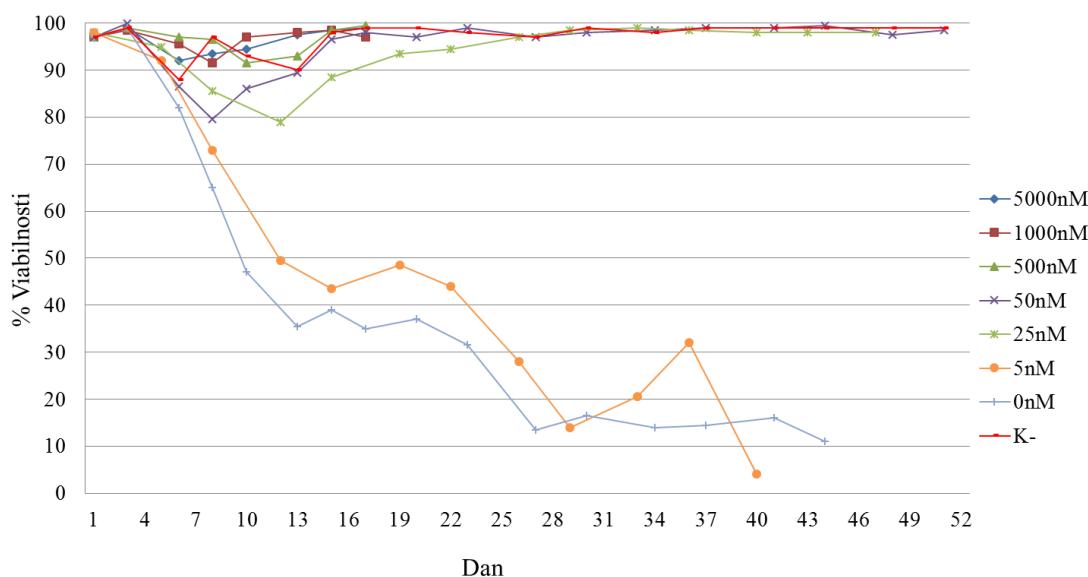


**Graf 2** Povprečje viabilnosti parentalne celične linije CHO-Der2 pri znižani koncentraciji folne kisline

Celice smo gojili pri različnih koncentracijah folne kisline v rastnem mediju. Za negativno kontrolo (K-) smo celice gojili v običajnem rastnem mediju, z 11,3  $\mu$ M folno kislino

Iz zbranih rezultatov smo zaključili, da parentalna celična linija CHO-Der2 lahko preživi pri vsaj 5 nM folni kislini v rastnem mediju.

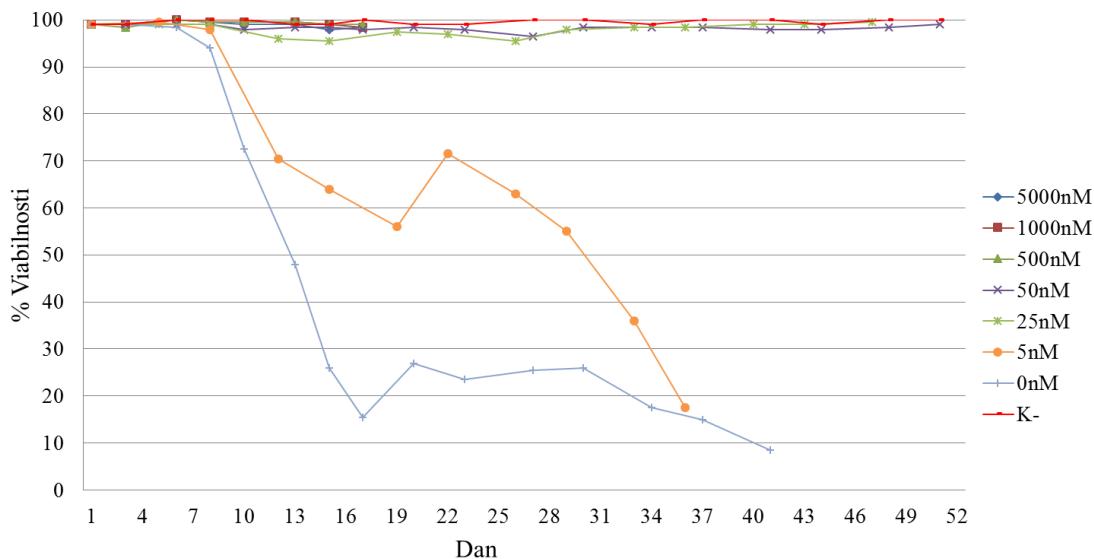
Iz Grafa 3 lahko vidimo, da je bil odziv na znižano koncentracijo folne kisline pri parentalni celični liniji CHO-Der3 najhitrejši. Pri kulturi, ki je rasla v rastnem mediju z vsaj 500 nM folne kisline, nismo opazili večjih sprememb v viabilnosti - ves čas je bila nad 90 %. Pri koncentracijah 50 in 25 nM folne kisline smo zaznali rahel padec viabilnosti. Celice pri 50 nM folni kislini so si opomogle hitreje, v primerjavi s tistimi, ki so rasle pri 25 nM folni kislini. Celična kultura CHO-Der3 tudi po daljšem gojenju ni preživelala pri koncentraciji folne kisline nižji ali enaki od 5 nM.



**Graf 3** Povprečje viabilnosti parentalne celične linije CHO-Der3 pri znižani koncentraciji folne kisline

Celice smo gojili pri različnih koncentracijah folne kisline v rastnem mediju. Za negativno kontrolo (K-) smo celice gojili v običajnem rastnem mediju, z 11,3  $\mu$ M folno kislino

Pri parentalni celični liniji CHO-Der5 je bila meja med zadostno in prenizko koncentracijo folne kisline najbolj jasno izražena. Celice, ki smo jih gojili pri 25 nM ali višji koncentraciji folne kisline, so brez težav skozi daljše časovno obdobje ohranjale viabilnost nad 90 %, večjih nihanj ni bilo opaziti. Padec viabilnosti pri 5 nM smo zaznali šele po 9 dneh, kar nakazuje, da je parentalna celična linija CHO-Der5 sposobna dalj časa vzdrževati notranje zaloge folatov, je poraba folatov manjša ali pa ima večjo kapaciteto prenosa folatov iz zunanjega okolja v notranjost celic. Najnižja testirana koncentracija folne kisline, pri kateri so celice sposobne preživeti je v primeru parentalne celične linije CHO-Der5 25 nM.



**Graf 4** Povprečje viabilnosti parentalne celične linije CHO-Der5 pri znižani koncentraciji folne kisline

Celice smo gojili pri različnih koncentracijah folne kisline v rastnem mediju. Za negativno kontrolo (K-) smo celice gojili v običajnem rastnem mediju, z  $11,3 \mu\text{M}$  folno kislino

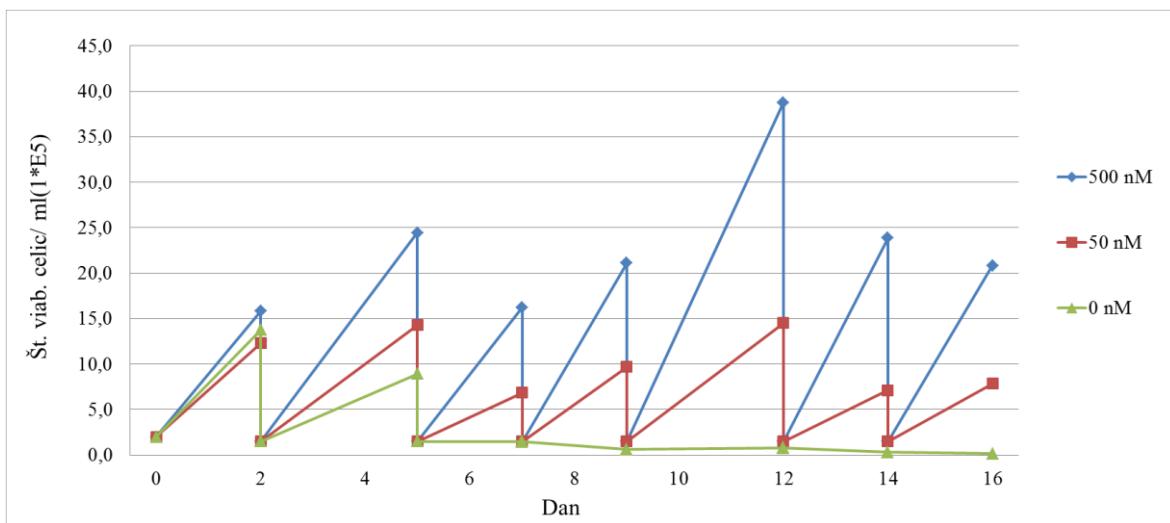
Če preiskovane parentalne celične linije med seboj primerjamo, lahko povzamemo, da sta si celični liniji CHO-Der1 in -Der3 med seboj podobni v hitrem padcu viabilnosti pri močno znižanih koncentracijah folne kisline, medtem ko smo pri celičnima linijama CHO-Der2 in -Der5 to opazili šele po nekaj pasažah. Notranje zaloge folatov so za krajše časovno obdobje zadostne, po večkratni delitvi celic pa te postanejo prenizke, kar se odrazi na celični viabilnosti. Pri primerjavi koncentracije folne kisline, ki je celicam še omogočala preživetje, pa lahko zaključimo, da imata podoben odziv parentalni celični liniji CHO-Der1 in -Der2 (5 nM) ter CHO-Der3 in -Der5 (25 nM).

#### 4.1.2 Vpliv znižane folne kisline na rast parentalne celične linije CHO-Der5

Čeprav nas je v prvi vrsti zanimala viabilnost celične linije pri znižani koncentraciji folne kisline, pa je zelo pomembno, da celična linija ohrani tudi dovolj hitro rast, saj drugače za namene produkcije biološkega zdravila ni uporabna. Ker smo za nadaljevanje poskusov uporabili le celično linijo CHO-Der5, so prikazani rezultati samo te celične linije.

Pričakovano je, da hitro rastoče celice potrebujejo več folatov, kot počasi rastoče celice. Michelle in sodelavci so v eni izmed študij s petimi različnimi celičnimi linijami spremljali privzem folne kisline preko FR $\alpha$  v celice pri različnih stopnjah rasti (44). Pokazali so, da se funkcija receptorja FR $\alpha$  pri štirih preučevanih celičnih linijah zmanjša, kadar je celična rast upočasnjena. To nakazuje na zmanjšanje funkcije FR $\alpha$ , zaradi manjše potrebe celic po tem vitaminu.

Na Grafu 5 je prikazana gostota viabilnih celic parentalne celične linije CHO-Der5 med daljšim gojenjem pri znižani koncentraciji folne kisline v rastnem mediju. Za lažjo predstavo so prikazane le gostote celic, ki smo jih gojili pri 500 nM, 50 nM in 0 nM folni kislini, saj pri koncentracijah višjih od 500 nM ni bilo opaziti vpliva na celično rast. Po pričakovanjih so se celice z nižjo koncentracijo folne kisline v rastnem mediju delile počasneje in so v enakem časovnem obdobju dosegle nižjo celično gostoto, kot tiste pri višji koncentraciji folne kisline.



**Graf 5** Povprečje gostote celic parentalne celične linije CHO-Der5 pri različnih koncentracijah folne kisline.

## 4.2 Poskus II

### 4.2.1 Vpliv znižane koncentracije folne kisline in dodatka metotreksata pri transficirani celični liniji CHO-Der5

Poskuse smo nadaljevali le s celično linijo CHO-Der5. Želeli smo testirati uspešnost selekcije transficirane celične linije CHO-Der5 brez uporabe antibiotika, torej le z znižano koncentracijo folne kisline v rastnem mediju in dodatkom metotreksata (MTX), ter izmeriti produktivnost zbirkov. Takšen način selekcije so zasnovali raziskovalci v Novartisovem laboratoriju in zanjo vložili patentno zaščito (45). Zaradi uporabe različnih derivatov celične linije CHO pri razvoju bioloških zdravil, smo želeli omenjeni način selekcije testirati na specifičnih celičnih linijah, ki jih uporabljamo v Biofarmacevtiki, Lek d.d. Derivati celične linije CHO se med seboj razlikujejo v številnih lastnostih, med drugim tudi v samem metabolizmu folne kisline (Poskus I). Ker se v našem laboratoriju trenutno najpogosteje uporablja CHO-Der5, smo poskuse nadaljevali le s to celično linijo.

Ekspresijski vektor (FR $\alpha$ \*/DHFR) smo zaradi lažjega vstavljanja v genom linearizirali z restriktionsko endonukleazo. Celice smo transficirali s pomočjo nukleofektorja, pri čemer smo za posamezno transfekcijo uporabili 3 µg pDNA. Poleg tega smo za namen preverjanja uspešnosti transfekcije pripravili tudi pozitivno in negativno kontrolo. Za pozitivno kontrolo smo celice transficirali z vektorjem, označenim z GFP, pri negativni pa smo celice izpostavili enakim pogojem transfekcije, vendar brez uporabe vektorja. Po 48 h smo kontroli pomerili na pretočnem citometru, kjer so rezultati pokazali dobro učinkovitost transfekcije.

Poskus je temeljal na testiranju različnih kombinacij koncentracij folne kisline in MTX v rastnem mediju pri CHO-Der5 celični liniji po uspešni transfekciji. Dokazano je, da folatni receptor (FR) celicam omogoča preživetje pri nižjih koncentracijah folatov v rastnem mediju, kar podpirajo številne ugotovitve (46, 47, 48). Luhrs in sodelavci so celice, ki normalno ne izražajo folatnega receptorja, transficirali s cDNA, ki kodira folatni receptor. Ugotovili so, da transficirane celice lahko rastejo pri pogojih z nizko koncentracijo folatov, pri katerih normalno ne bi preživele. Prav tako so Ebel in sodelavci transficirali CHO-K1 celično linijo z genom za FR $\alpha$  in primerjali rast s parentalno CHO-K1 celično linijo. Rezultati so pokazali, da je koncentracija, pri kateri preživi 50 % celic, 54 - krat nižja pri s FR $\alpha$  transficiranimi celicami, kot parentalnimi CHO-K1 celicami. FR $\alpha$  torej zagotavlja

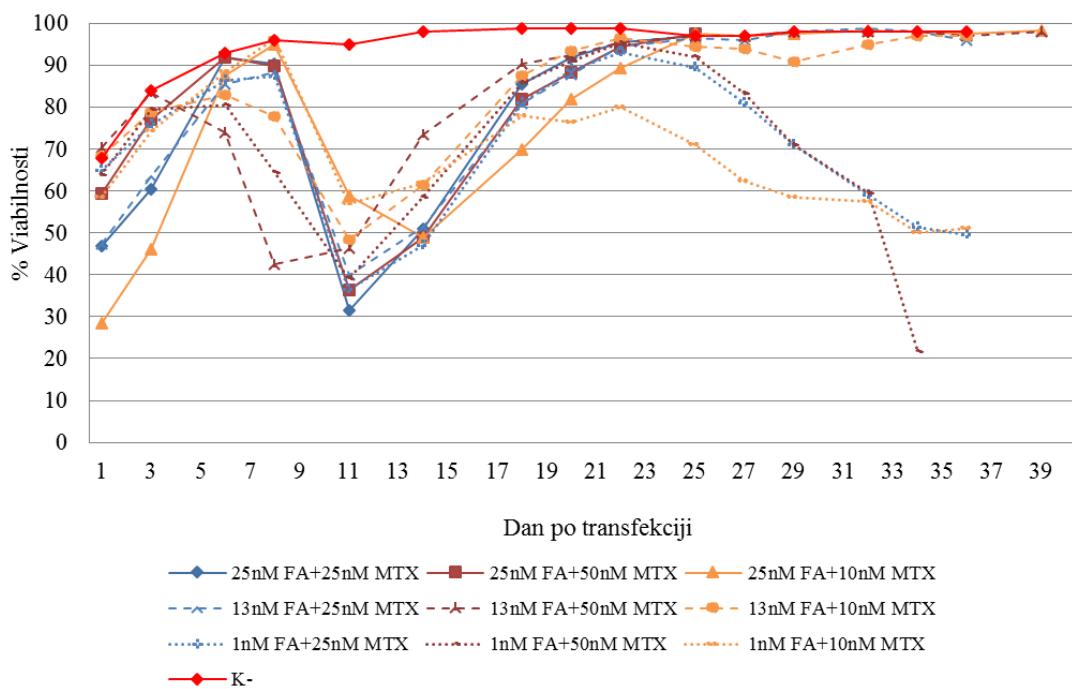
mehanizem, ki vzdržuje zadostne količine folatov znotrajcelično in jim s tem omogoči preživetje pri znižani koncentraciji folatov v rastnem mediju.

Na podlagi rezultatov poskusa v poglavju 4.1.1 in 4.1.2 smo se za transficirano CHO-*Der5* celično linijo odločili, da bo 25 nM folna kislina zgornja mejna koncentracija v rastnem mediju. Če je netransficirana CHO-*Der5* celična linija uspešno preživelja pri 25 nM folni kislini, smo sklepali, da ji bo transfekcija z ekspresijskim vektorjem za FR $\alpha^*$  omogočila rast tudi pri nižjih koncentracijah folne kisline v rastnem mediju. Upoštevati pa smo morali, da celice po transfekciji ne bodo izpostavljene le pritisku znižane koncentracije folne kisline, temveč tudi antifolatu - metotreksatu. Glavni prenašalni sistem za MTX je reducirani folatni prenašalec, vendar pa se v majhnih količinah prenaša tudi preko folatnega receptorja, še zlasti pri nizkih koncentracijah folne kisline (49). Ker oba delujeta na mehanizem encima DHFR, je koncentracija tako folne kisline kot MTX odvisna ena od drugega. Oba selekcijska označevalca sta del istega metabolnega mehanizma, njun učinek je aditiven/sinergističen, torej je selekcijski pritisk na preživele celice zelo velik. V literaturi smo zaznali primer KB celične linije, ki so jo gojili pri visoki koncentraciji folatov (2,3  $\mu$ M) in 25 nM MTX. Dokler je bila koncentracija folatov v rastnem mediju visoka, je bila celična rast običajna, kljub prisotnosti MTX. Ko pa so folate v rastnem mediju znižali na fiziološko raven, koncentracijo MTX pa ohranili enako, je prišlo do močnega zaviranja rasti in občutno večje citotoksičnosti MTX. Celice naj bi pri nižji koncentraciji ekstracelularnih folatov v večjih količinah privzemale MTX, ki naj bi se tudi dlje časa zadrževal v celicah in zato imel večji citotoksični učinek. Kadar je koncentracija ekstracelularnih folatov v presežku, pa MTX tekmuje za vezavna mesta na folatnih receptorjih, manj MTX lahko vstopi skozi membrano in je njegov citotoksičen učinek zato manjši (49).

Po transfekcijah CHO-*Der5* celične linije z ustreznim ekspresijskim vektorjem smo zbirke gojili pri 25, 13 ali 1 nM folni kislini v dveh bioloških ponovitvah. Ko je viabilnost zbirkov presegla 75 %, smo rastnemu mediju dodali 10, 25 ali 50 nM MTX. Za negativno kontrolo (K-) smo en zbirko gojili pri 13 nM folni kislini, vendar brez dodatka MTX (Preglednica VII). Zbirke smo 3 - krat tedensko vzorčili na aparatu za določanje gostote in viabilnosti celic *ViCell*, pravtako 3 - krat tedensko smo zbirkom dodali rastni medij, oziroma jih po potrebi precepili. Rezultati viabilnosti zbirkov v dveh bioloških ponovitvah, vključno z negativno kontrolo, so prikazani na spodnjem grafu (Graf 6).

### Preglednica VII Koncentracija folne kisline in MTX pri zbirkih

Zbirk	Celična linija	Ekspresijski vektor	Folna kislina (nM)	MTX (nM)
P1	CHO-Der5	FRα*/DHFR	25	50
P2	CHO-Der5	FRα*/DHFR	25	50
P3	CHO-Der5	FRα*/DHFR	25	25
P4	CHO-Der5	FRα*/DHFR	25	25
P5	CHO-Der5	FRα*/DHFR	25	10
P6	CHO-Der5	FRα*/DHFR	25	10
P7	CHO-Der5	FRα*/DHFR	13	50
P8	CHO-Der5	FRα*/DHFR	13	50
P9	CHO-Der5	FRα*/DHFR	13	25
P10	CHO-Der5	FRα*/DHFR	13	25
P11	CHO-Der5	FRα*/DHFR	13	10
P12	CHO-Der5	FRα*/DHFR	13	10
P13	CHO-Der5	FRα*/DHFR	1	50
P14	CHO-Der5	FRα*/DHFR	1	50
P15	CHO-Der5	FRα*/DHFR	1	25
P16	CHO-Der5	FRα*/DHFR	1	25
P17	CHO-Der5	FRα*/DHFR	1	10
P18	CHO-Der5	FRα*/DHFR	1	10
K-	CHO-Der5	FRα*/DHFR	13	0



**Graf 6** Povprečja viabilnosti zbirkov celične linije CHO-Der5 po transfekciji

Zbirke smo gojili pri različnih koncentracijah folne kisline (FA) in metotreksata (MTX). Za negativno kontrolo (K-) smo transficirane celice gojili pri 13 nM FA, v odsotnosti MTX.

Zbirke smo prvič vzorčili na aparatu *ViCell* že dan po transfekciji. Pričakovano je bila celična viabilnost takoj po transfekciji pri vseh zbirkah nizka, saj z uporabo elektroporacije celice poškodujemo. Pri majhnemu deležu celic pa s postopkom elektroporacije dosežemo, da eksprejski vektor vstopi v celico in se vgradi v celični genom. Takšne celice imajo možnost preživetja pri selekcijskih pogojih.

Iz Grafa 6 je razvidno, da se je viabilnost vsem zbirkom nekaj dni po dodatku MTX močno znižala; nekaterim tudi pod 40 %. Takšen odziv je običajen, saj je MTX inhibitor encima DHFR, kar se odraža na upočasnjeni rasti in odmrту deleža celic. Ob upoštevanju, da smo zbirke po transfekcijah izpostavili tudi znižani koncentraciji folne kisline, smo pričakovali še večji padec viabilnosti. Zbirki, ki smo jim dodali le 10 nM MTX, ne glede na koncentracijo folne kisline, so obdržali malenkost višjo viabilnost. Pri zbirkah s 25 in 50 nM MTX ni bilo opaziti razlike v odzivu na koncentracijo MTX. Pri negativni kontroli, ki smo jo gojili pri 13 nM folni kislini in brez dodatka MTX, nismo opazili večjega nihanja viabilnosti skozi daljši čas gojenja. Iz tega lahko sklepamo, da 13 nM folna kislina uspešno transficirani celični liniji CHO-Der5 omogoča zadostno količino folatov za normalno rast. Krivulje viabilnosti so si v fazi močnega selekcijskega pritiska in v fazi ponovnega dviga viabilnosti zbirkov podobne. V zadnji fazi se zbirki, ki so rastli pri le 1 nM folni kislini, niso uspeli ohranjati in so postopoma odmrli. Pri vseh kombinacijah koncentracij folne kisline in MTX smo opazili postopno regeneracijo, v povprečju pa so zbirki po transfekciji potrebovali 20 dni, da so prešli selekcijski pritisk.

Vsi zbirki, ki smo jih gojili pri zgolj 1 nM folni kislini (P13 – P18), ne glede na dodano koncentracijo MTX, selekcijskega pritiska niso preživelci. Čeprav je tudi pri teh zbirkah sprva kazalo na regeneracijo, je bilo ob pospešenemu pomnoževanju celic po selekcijski krizi folne kisline v rastnem mediju premalo. V literaturi smo opazili številne primere, kjer je bila tudi 1 nM folna kislina zadostna za preživetje, vendar pa gre pri našem poskusu za kombinacijo folne kisline in MTX. Čeprav MTX v večji meri vstopa v celice preko reduciranega folatnega prenašalca in ne folatnega receptorja (50), pa oba principa selekcije delujeta na folatni metabolizem in sta tako odvisna drug od drugega.

MTX sodeluje v folatnem metabolizmu, saj inhibira delovanje encima DHFR, ki je eden od ključnih metabolnih encimov. Da bi celice lahko prenesle selekcijski pritisk MTX, pride do amplifikacije gena *dhfr*, kar celicam omogoča rast tudi pri višjih koncentracijah MTX. Zaradi konstrukcije eksprejskega vektorja se hkrati amplificira tudi tarčni gen, s čimer

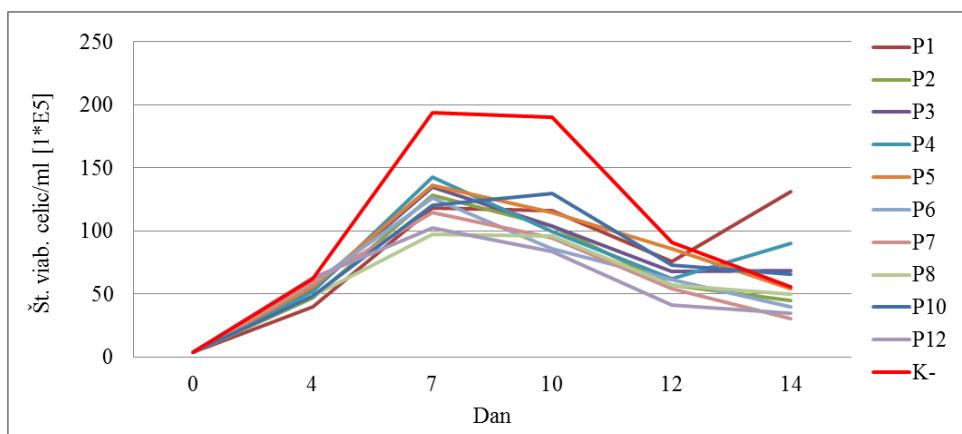
povečamo produktivnost celične linije. Po regeneraciji se zaradi uspešne amplifikacije gena *dhfr* ponovno pospeši celična rast, kar še poviša potrebe po folatih, ki jih pri 1 nM folni kislini v rastnem mediju ni bilo dovolj.

Pri poskusu smo prav tako opazili, da je regeneracija transficiranih zbirkov CHO-*Der5* celične linije po testiranem pristopu selekcije hitrejša. Čas, ki je potreben od transfekcij do nacepitev 14-dnevne dohranjevalne šarže in določitve produktivnosti je krajši v primerjavi s protokolom, ki ga običajno upoštevamo pri razvoju produkcijske celične linije za podobna biološka zdravila v Biofarmaceutiki, Lek, d.d.

#### 4.2.2 Produktivnost po selekciji z znižano koncentracijo folne kisline in dodatku MTX

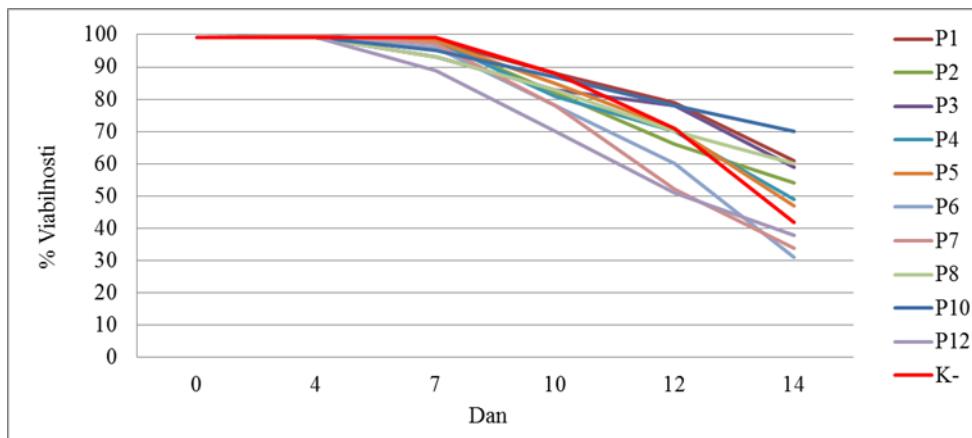
Transficirane zbirke celične linije CHO-Der5 smo po selekciji nacepili na 14-dnevno dohranjevalno šaržo. Tokrat smo uporabili prilagojen osnovni rastni medij z običajno koncentracijo folne kisline ( $11,3 \mu\text{M}$ ), koncentracija MTX pa je bila med 14-dnevno dohranjevalno šaržo enaka kot med selekcijo (Preglednica VII). Zbirkom smo med 14-dnevno dohranjevalno šaržo dodajali hranila po običajni shemi, ki se uporablja v Biofarmacevtiki, Lek d.d.. Z dohranjevalno šaržo dosežemo visoko gostoto celic v rastni plastenki in s tem možnost za visoko produktivnost. Je nekakšna simulacija procesa v bioreaktorju, vendar preprostejša in v manjši velikosti. Z dobljenimi podatki o gostoti, viabilnosti in produktivnosti zbirkov v različnih časovnih točkah dohranjevalne šarže lahko predvidevamo, kako se bo posamezen zbirk obnašal v kasnejšem razvoju bioprosesa. Poleg analitskih rezultatov o kvaliteti produkta, rezultati 14-dnevne dohranjevalne šarže služijo kot prva ocena lastnosti producentov in nam pomagajo pri izbiri zbirkov, ki jih bomo vključili v nadaljni razvoj (kloniranje).

Gostota in viabilnost zbirkov smo na aparatu *ViCell* določili na dan 4, 7, 10, 12 in 14 (Graf 7 in Graf 8). Rezultati produktivnosti zbirkov, ki smo jih določili na analizatorju *Octet QK* na dan 7, 10 in 14, pa so prikazani na Grafu 9. Zbirka P9 in P11 nismo uspeli nacepiti na 14-dnevno dohranjevalno šaržo, saj kljub visoki viabilnosti nista dosegla zadostne gostote celic v primerenem času. Zbirki P13, P14, P15, P16, P17 in P18, ki smo jih med selekcijo gojili pri zgolj  $1 \text{ nM}$  folni kislini v rastnem mediju, selekcije niso preživeli.

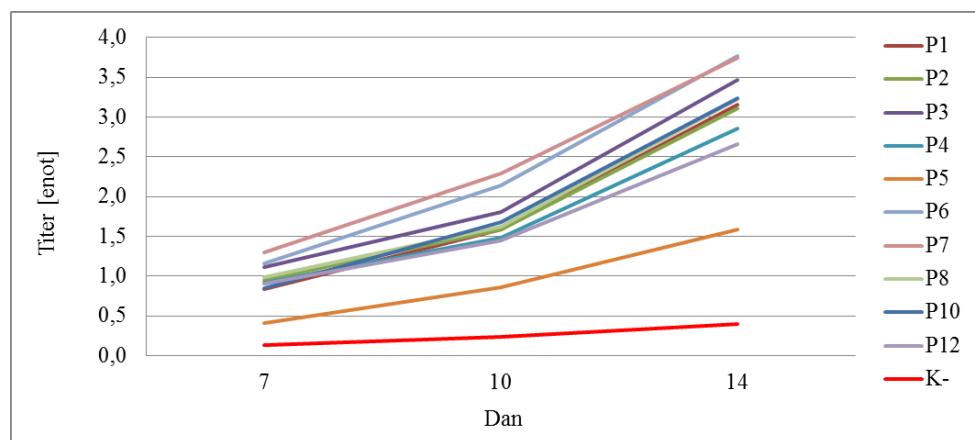


**Graf 7** Gostota celic zbirkov med 14-dnevno dohranjevalno šaržo

Prikazane so gostote zbirkov, gojenih pri različnih kombinacijah FA in MTX, med 14-dnevno dohranjevalno šaržo. Kot negativno kontrolo (K-) smo prikazali gostoto zbirke, ki smo ga gojili pri  $13 \text{ nM}$  FA, vendar z odsotnostjo MTX.

**Graf 8** Viabilnost celic zbirkov med 14-dnevno dohranjevalno šaržo

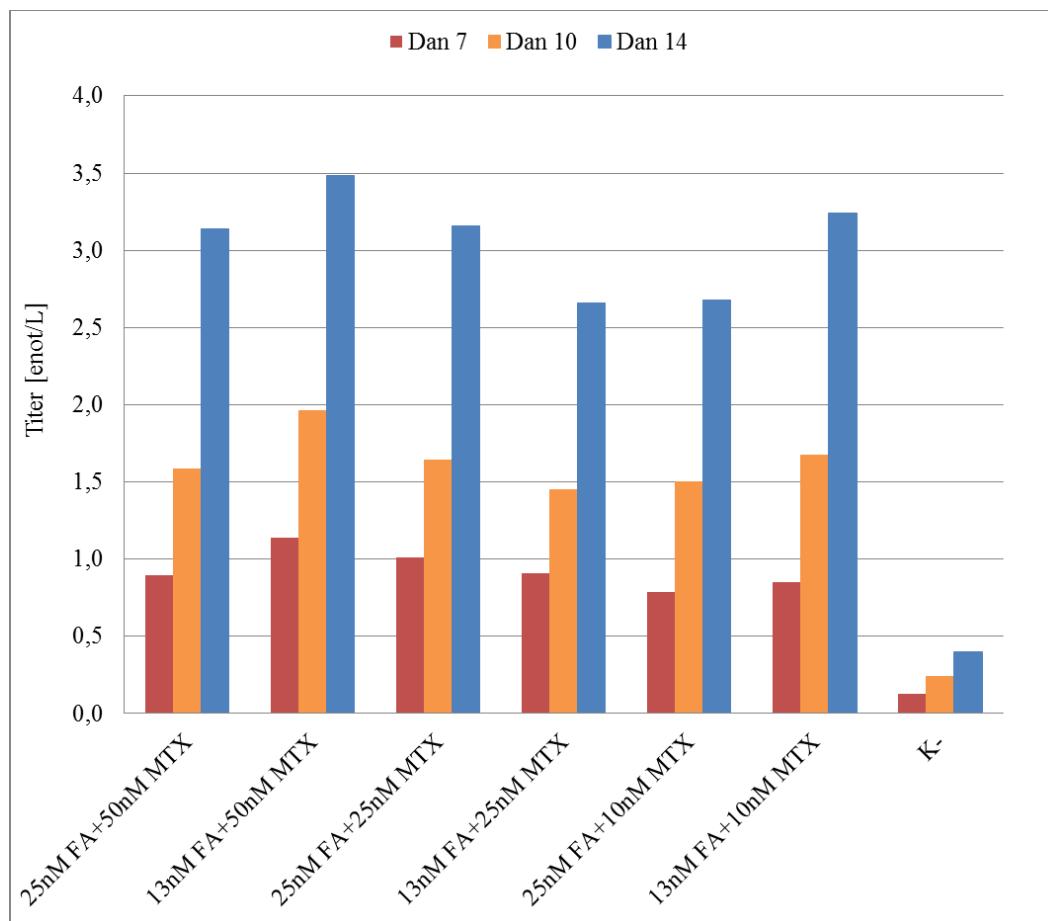
Prikazane so viabilnosti zbirkov, gojenih pri različnih kombinacijah FA in MTX, med 14-dnevno dohranjevalno šaržo. Kot negativno kontrolo (K-) smo prikazali viabilnost zbirke, ki smo ga gojili pri 13 nM FA, vendar z odsotnostjo MTX.

**Graf 9** Produktivnost zbirkov med 14-dnevno dohranjevalno šaržo

Prikazane so produktivnosti zbirkov, gojenih pri različnih kombinacijah FA in MTX, med 14-dnevno dohranjevalno šaržo. Kot negativno kontrolo (K-) smo prikazali produktivnost zbirke, ki smo ga gojili pri 13 nM FA, vendar z odsotnostjo MTX.

Rezultati merjenja titrov so pokazali, da je bila selekcija uspešna, kar se odraža na visoki produktivnosti zbirkov. Na dan 14 so vse preizkušene kombinacije v povprečju dosegle titer višji kot 3 enote/L (Graf 10). Najvišji titer je pokazala kombinacija 13 nM folne kisline in 50 nM MTX, povprečno 3,5 enote/L. Pri kontrolnem vzorcu, ki smo ga gojili pri 13 nM folni kislini in v odsotnosti MTX, smo izmerili povprečni titer le 0,4 enote/L. Iz tega lahko sklepamo, da dodatek zgolj 10 nM MTX močno poveča produktivnost

transficiranih celic. Kljub nizkim koncentracijam MTX (do 50 nM) smo dosegli visoko produktivnost, kar gre pripisati dodatnemu selekcijskemu pritisku znižane koncentracije folne kisline v rastnem mediju. Z močno selekcijo se tudi povprečna produktivnost zbirkov zviša, saj slabi producenti ne preživijo selekcijskega pritiska (45). Prednost tega je v manjšem številu potrebnih generiranih zbirkov.

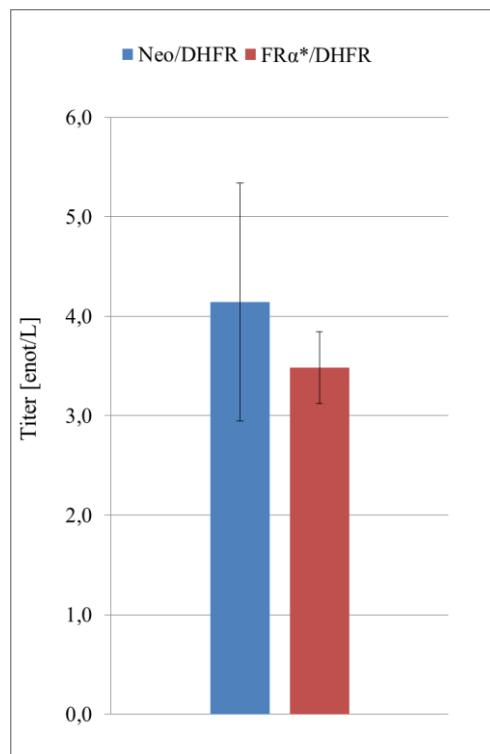


**Graf 10** Povprečje produktivnosti zbirkov celične linije CHO-Der5 med 14-dnevno dohranjevalno šaržo

Prikazane so produktivnosti zbirkov, gojenih pri različnih kombinacijah folne kisline (FA) in metotreksata (MTX). Produktivnost je bila merjena na dan 7, 10 in 14. Kot negativno kontrolo (K-) smo prikazali produktivnost zbirka, ki smo ga gojili pri 13 nM FA, vendar z odsotnostjo MTX.

Če primerjamo testiran pristop selekcije zbirkov z običajnim postopkom selekcije, je zanimivo, da smo dosegli skoraj enako visoko produktivnost zbirkov pri kar 10 x nižji koncentraciji MTX (Graf 11). Pri običajni selekciji z antibiotikom in 500 nM MTX smo pri produkciji enakega monoklonskega protitelesa v enaki celični liniji generirali zbirke s povprečnim titrom 4,1 enot/L (Op.a.: Podrobnejši podatki niso zajeti v magistrsko delo in so del rednih projektov v Biofarmacevtiki, Lek, d.d.). Pri tem je potrebno upoštevati

dejstvo, da je običajen protokol v rutinski uporabi, medtem ko so rezultati s testiranim pristopom selekcije preliminarni in potrebni nadaljnje optimizacije. Ker so produktivnosti na nivoju zbirkov slabo ponovljive, je priporočljivo generirati večje število zbirkov, saj s tem povečamo možnost najdbe višjih producentov. Naš rezultat nakazuje na uspešno selekcijo celične linije CHO-Der5 z znižano folno kislino in dodatkom MTX, saj smo že brez optimizacije procesa uspeli generirati zbirke s povprečno produktivnostjo 3,5 enot/L. Znano je, da je MTX genotoksičen in zlasti pri visokih koncentracijah lahko povzroči mutacije v celičnem genomu (45), zato je velika prednost uporabe nižjih koncentracij MTX pri selekciji. Lahko se tudi zgodi, da visoke koncentracije MTX med selekcijo povzročijo mutacijo v genu za reducirani folati prenašalec ali celo izgubo njegove funkcije. Ker pa je reducirani folatni prenašalec glavni prenašalec MTX v notranjost celic, to lahko privede do odpornosti zbirkov na MTX (50), kar se odraža na slabi produktivnosti.



**Graf 11** Primerjava produktivnosti zbirkov celične linije CHO-Der5

Primerjali smo produktivnost transfisirane CHO-Der5 celične linije za enako monoklonsko protitelo, kjer je bila selekcija izvedena po običajnem (Neo/DHFR) in testiranem protokolu (FR $\alpha^*$ /DHFR). Pri običajnem protokolu smo za selekcijo uporabili 0,8 mg/ml geneticina in 500 nM MTX, pri testiranem protokolu pa kombinacijo 13 nM FA in 50 nM MTX. Običajen protokol je v rutinski uporabi, medtem ko so rezultati s testiranim pristopom selekcije preliminarni in potrebni nadaljnje optimizacije.

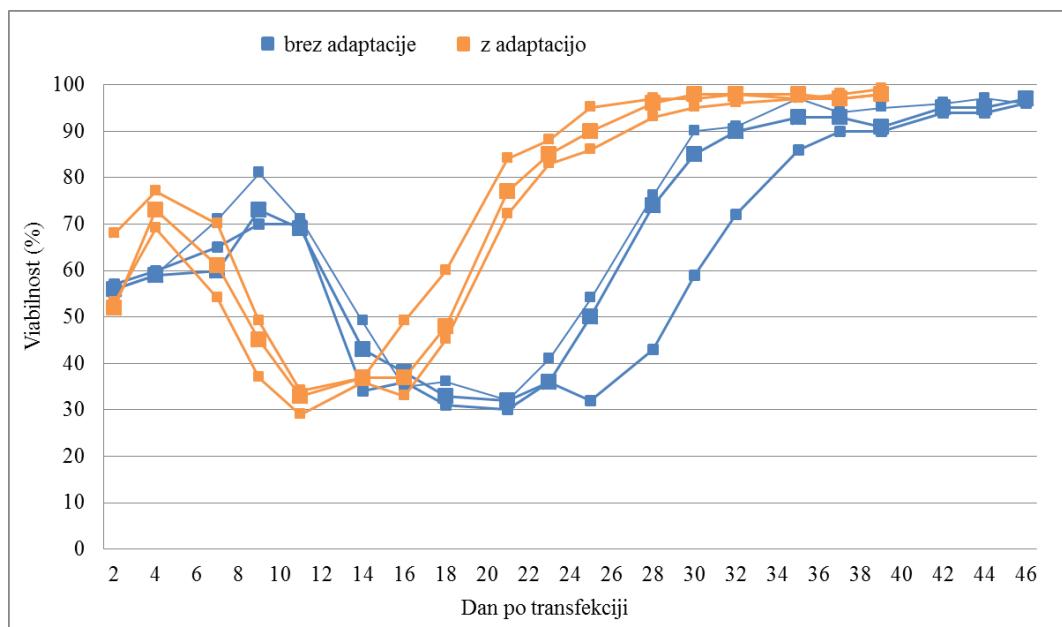
Pri interpretaciji rezultatov ne smemo pozabiti, da smo testirali le začetno stopnjo razvoja produkcijske celične linije CHO-Der5 in generirali le zbirke. Za boljše rezultate bi potrebovali večje število transficiranih zbirkov pri vsaki kombinaciji koncentracije folne kisline in MTX, nujna pa bi bila tudi nadaljnja optimizacija postopka selekcije. Prav tako bi bilo smiselno najvišje producente tudi klonirati in spremljati, kakšen vpliv ima testirani pristop selekcije na produktivnost in kvaliteto klonov.

## 4.3 Poskus III

### 4.3.1 Primerjava regeneracije in produktivnosti CHO-Der5 celične linije pri adaptaciji na znižano koncentracijo folne kislino pred transfekcijo

Čeprav smo uspeli generirati visoko produkcijske zbirke, smo želeli testirati še nekoliko drugačen pristop, pri katerem se parentalne celice že pred transfekcijo z ekspresijskim vektorjem goji v rastnem mediju z znižano koncentracijo folne kislino in se jih na ta način adaptira (45). Prilagoditev celic takšnim pogojem naj bi jim omogočila hitrejšo regeneracijo po transfekciji.

Rastno plastenko s parentalno celično linijo CHO-Der5 smo dva tedna pred transfekcijo gojili v rastnem mediju, ki je vseboval le 13 nM folno kislino, pred tem pa več kot mesec dni pri 25 nM folni kislini. Vzporedno smo enake celice gojili v običajnem rastnem mediju, ki vsebuje 11,3  $\mu$ M folno kislino. Po transfekcijah z ekspresijskim vektorjem (FR $\alpha^*$ /DHFR) smo obe skupini celic gojili v rastnem mediju s 13 nM folno kislino. Z dodatkom 50 nM MTX smo dodatno povečali selekcijski pritisk in jih po regeneraciji nacepili na 14-dnevno dohranjevalno šaržo.

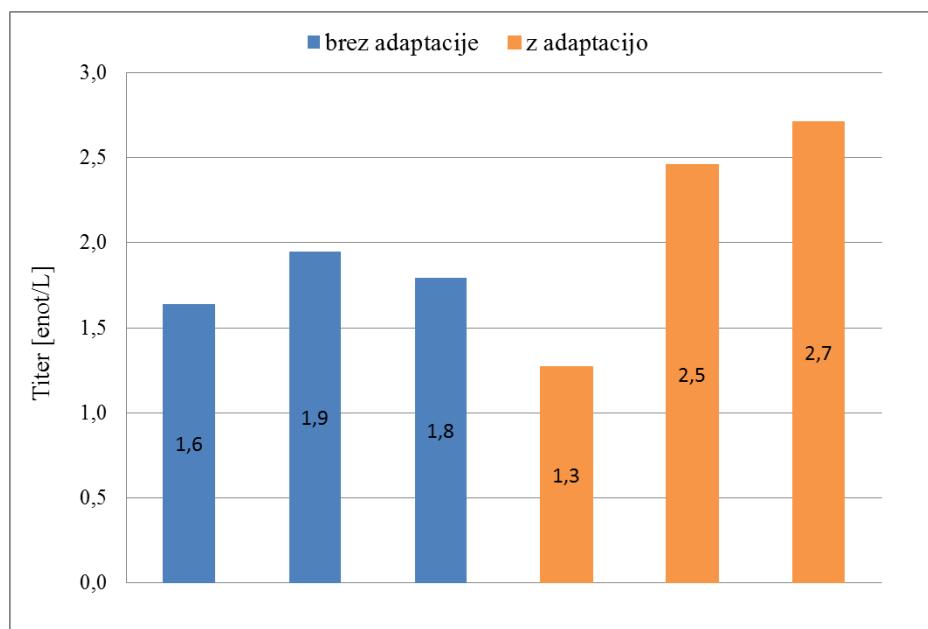


**Graf 12** Viabilnost adaptiranih in neadaptiranih zbirkov po transfekciji

Adaptirane zbirke smo že pred transfekcijo gojili v rastnem mediju z znižano koncentracijo FA (13 nM). Po transfekciji pa smo vse zbirke gojili pri enakih selekcijskih pogojih (13 nM FA in 50 nM MTX).

Rezultati so potrdili pričakovanja in pokazali hitrejšo regeneracijo adaptiranih zbirkov po transfekciji in dodatku MTX (Graf 12). Že takoj po transfekcijah smo opazili razliko med adaptiranimi in neadaptiranimi zbirkami. Neadaptirani zbirkki so potrebovali skoraj teden dni časa dlje, da je viabilnost po transfekciji dosegla vsaj 70 %. Po dodatku 50 nM MTX pa je bila regeneracija neadaptiranih zbirkov do 90 % viabilnosti v povprečju 10 dni daljša. V biotehnološkem procesu proizvodnje bioloških zdravil ima čas veliko vlogo, saj so s tem povezani visoki stroški.

Pri produktivnosti smo opazili manjšo razliko med zbirkami, ki smo jih že pred transfekcijo gojili v rastnem mediju z znižano koncentracijo folne kisline (adaptirani) in tistimi, pri katerih smo koncentracijo folne kisline znižali šele po transfekciji (neadaptirani) – Graf 13. Menimo, da adaptacija celic na znižano koncentracijo folne kisline pred transfekcijo bistveno ne pripomore k višji produktivnosti zbirkov.



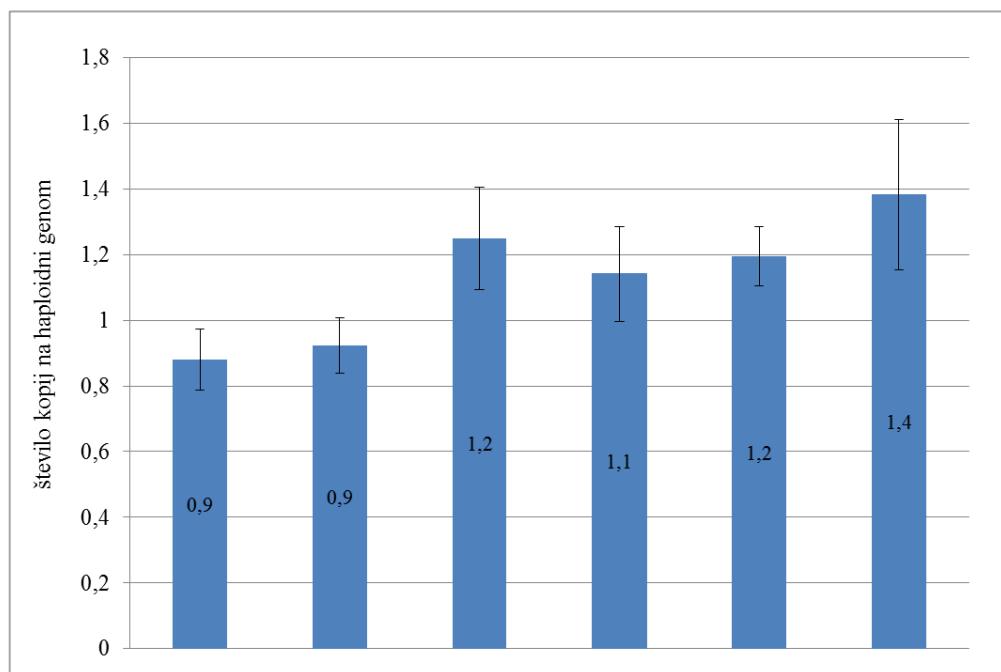
**Graf 13** Produktivnost adaptiranih in neadaptiranih zbirkov na zadnji dan 14-dnevne dohranjevalne šarže

Adaptirane zbirke smo že pred transfekcijo gojili v rastnem mediju z znižano koncentracijo FA (13 nM). Po transfekciji smo vse zbirke gojili pri enakih seleksijskih pogojih (13 nM FA in 50 nM MTX).

#### 4.3.2 Določanje števila kopij gena *FRα\** pri transficiranih zbirkih

Z metodo qPCR smo želeli preveriti število kopij gena *FRα\** med posameznimi zbirkami iz Poskusa III (poglavje 4.3). Kot referenčni gen smo uporabili endogeni gen *GLUC* in iz standardne krivulje določili število kopij za endogeni gen in jih primerjali s Ct vrednostmi analiziranih zbirkov.

Iz dobljenih rezultatov sklepamo, da bistvene razlike v številu kopij med posameznimi zbirkami ni, saj se med seboj v številu kopij ne razlikujejo za več kot 30 % (znotraj variabilnosti qPCR metode).



**Graf 14** Število kopij gena *FRα\** pri zbirkah

Posamezen rezultat predstavlja povprečje treh tehničnih ponovitev s standardno deviacijo.

## 5 SKLEP

V okviru moje magistrske naloge smo poskušali ovrednotiti selekcijo CHO-Der5 celične linije z izražanjem folatnega receptorja v zgodnjem razvoju bioloških zdravil.

- Ugotovili smo, da med posameznimi derivati celične linije CHO obstajajo razlike pri odzivu parentalnih celic na znižane koncentracije folne kisline v rastnem mediju.
- Pri spremeljanju vpliva znižane folne kisline v rastnem mediju na rast celične linije CHO-Der5 smo ugotovili, da je koncentracija folne kisline v običajnem rastnem mediju v močnem presežku. Nižanje koncentracije folne kisline vse do 500 nM ni imelo bistvenega vpliva na rast, pri nižjih koncentracijah, pa se je rast občutno upočasnila.
- Z novo selekcijsko metodo, ki temelji na izražanju gena za FR $\alpha^*$  in DHFR smo uspešno generirali visoko produkcijsko celično linijo CHO-Der5. Prednost takšne selekcije je med drugim tudi v uporabi nekajkrat nižjih koncentracij MTX, ki je genotoksičen.
- Adaptacija parentalne celične linije CHO-Der5 na znižano koncentracijo folne kisline omogoča zbirkom hitrejšo regeneracijo po transfekciji, vendar na produktivnost nima bistvenega vpliva
- Z metodo qPCR smo primerjali število kopij gena FR $\alpha^*$  med posameznimi transficiranimi zbirki in iz rezultatov ugotovili, da razlik znotraj testiranih zbirkov ni.

Glede na zgornje ugotovitve lahko povzamem, da je selekcija, ki temelji na izražanju gena za folatni receptor uspešna in obetavna. V prihodnjih poskusih bi bilo smiselno povečati število vzorcev, saj bi s tem zagotovili večjo statistično moč. Da bi lahko potrdili uporabo nove selekcijske metode in jo uporabili za razvoj produkcijske celične linije, bi morali s poskusi nadaljevati in posamezne zbirke klonirati. Opazovali bi, kako se kloni obnašajo na selekcijo s folno kislino in MTX, ter kako le-ta vpliva na njihovo genetsko raznolikost. Nadalje bi morali preveriti tudi genetsko stabilnost klonov skozi daljše časovno obdobje. V izvedenih poskusih smo transfekcije nadaljevali le s CHO-Der5 celično linijo, saj je v našem laboratoriju najbolj v uporabi, vendar pa bi bilo v prihodnje smiselno poskuse izvesti tudi pri ostalih derivatih CHO celične linije.

## Literatura

1. Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, Heyneker HL, Yansura DG, Crea R, Hirose T, Kraszewski A, Itakura K, Riggs AD: Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States 1979; 76:106–110
2. Walsh G: Biopharmaceutical benchmarks 2014. Nature Biotechnology 2014; 32: 992-1000
3. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila Od gena do učinkovine, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 673 str.
4. White Junod S: Celebrating a Milestone: FDA's Approval of First Genetically-Engineered Product (Dosegljivo 5.11.2014 na <http://www.fda.gov/AboutFDA/WhatWeDo/History/ProductRegulation/SelectionsFromFDLIUpdateSeriesonFDAHistory/ucm081964.htm>)
5. Jostock T, Knopf HP: Expression vector system comprising two selection markers. World Intellectual Property Organization, WO2010097240 A1, date of patent Sep. 02, 2010.
6. Wurm MF: Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nature biotechnology 2004; 22(11):1393–1398
7. Jo J, Tabata Y: Non-viral gene transfection technologies for genetic engineering of stem cells. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2008; 68(1): 90–104
8. Kunert R, Vorauer-Uhl K: Strategies for efficient transfection of CHO-cells with plasmid DNA. Methods in molecular biology 2012; 801:213-26
9. Jostock T, Knopf HP: Mammalian stable expression of biotherapeutics. Methods in molecular biology 2012; 899:227-38
10. Frenzel A, Hust M, Schirrmann T: Expression of recombinant antibodies. Frontiers in immunology 2013; 4:217
11. Butler M: Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. Appl Microbiol Biotechnol 2005; 68: 283–291
12. Tjio JH, Puck TT: Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. The Journal of Experimental Medicine 1958; 108(2): 259-68.

13. Wurm MF, Hacker D: First CHO genome. *Nature Biotechnology* 2011; 29:718–720
14. Jayapal KP, Wlaschin KF, Hu W, Yap MGS: Recombinant protein therapeutics from CHO cells – 20 years and counting. *Chemical Engineering Progress* 2007; 103(10): 40-47
15. Urlaub G, Chasin LA: Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolatereductase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1980; 77:4216–4220
16. Teissie J: Electroporation of the cell membrane. *Methods in molecular biology* 2014; 1121:25–46
17. Tsong TY: Electroporation of cell membranes. *Biophysical Journal* 1991; 60(2): 297–306
18. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofsneider PH: Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Journal* 1982; 1(7):841–845.
19. Yuan TF: Electroporation: an arsenal of application. *Cytotechnology* 2007; 54(2): 71–76
20. Southern PJ , Berg P: Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1982, 1(4):327-341
21. Birch JR, Racher AJ: Antibody production. *Advanced Drug Delivery Review*. 2006; 58(5-6):671-85Antibody production.
22. Urlaub G, Käs E, Carothers AM, Chasin LA: Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. *Cell*. 1983; 33(2): 405-12.
23. Obreza A: Sintezne zdravilne učinkovine v onkologiji. *Farmacevtski vestnik* 2009; 60: 48-60
24. Ifergan I, Assaraf YG: Molecular mechanisms of adaptation to folate deficiency. *Vitamines and hormones* 2008; 79:99-143
25. Schimke RT: Gene amplification in cultured animal cells. *Cell* 1984; 37:705-713
26. Wigler M, Perucho M, Kurtz D, et al: Transformation of mammalian cells with an amplifiable dominant-acting gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980; 77(6):3567-3570

27. Wurm FM, Gwinn KA in Kingston RE: Inducible overexpression of the mouse c-myc protein in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986; 83: 5414–5418
28. Rothen L, Berman B, Stark M, Jansen G, Assaraf YG: The reduced folate carrier gene is a novel selectable marker for recombinant protein overexpression. Molecular Pharmacology 2005; 68(3):616-24
29. Padmanabhan N, Jia D, Geary-Joo C, Wu X, Ferguson-Smith AC, Fung E, Bieda MC, Snyder F, Gravel RA, Cross JC, Watson ED: Mutation in Folate Metabolism Causes Epigenetic Instability and Transgenerational Effects on Development. Cell 2013;155(1): 81–93
30. Fox JT, Stover PJ: Folate-mediated one-carbon metabolism. Vitamins & Hormones 2008; 79:1-44
31. Matherly L, Goldman D: Membrane Transport of Folates. Vitamins & Hormones, Academic Press 2003; 66:403–456
32. Zhao R, Diop-Bove N, Visentin M, Goldman ID: Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia. Annual Review of Nutrition 2011; 31:177-201
33. Antony AC: Folate receptors. Annual review of nutrition 1996; 16:501-21
34. Antony AC, Tang YS, Khan R: Translational upregulation of folate receptors is mediated by homocysteine via RNA heterogeneus nuclear ribonucleoprotein E1 interactions. Journal of clinical investigation 2004; 113(2): 285-301.
35. Hsueh CT, Dolnick BJ: Altered folate-binding protein mRNA stability in KB cells grown in folate-deficient medium. Biochemical Pharmacology 1993; 45(12):2537-45
36. Elnakat H, Ratnam M: Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. Advanced Drug Delivery Review 2004;56(8):1067-84.
37. Tchantchou F, Shea TB: Chapter 3 Folate Deprivation, the Methionine Cycle, and Alzheimer's Disease. Vitamins & Hormones 2008; 79:83-97
38. Forte Bio, Inc.: Octet Platform brochure (Dosegljivo 6.11.2014 na: [http://www.mscience.com.au/upload/pages/fortebio/octet\\_platform\\_brochure\\_low-rez.pdf?1421382939](http://www.mscience.com.au/upload/pages/fortebio/octet_platform_brochure_low-rez.pdf?1421382939))

39. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L and others: The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 2006; 27(2-3): 95–125.
40. Wilhelm J, Pingoud A: Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem* 2003; 4(11): 1120–8.
41. Van Guilder in sod: Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 2008; 44(5):619-26.
42. Doležal J: Razvoj postopka kvantitativnega PCR v realnem času za določanje ravni izražanja nekaterih genov v celični liniji CHO-K1. Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, 2009.
43. James SJ, Basnakian AG, Miller BJ: In vitro folate deficiency induces deoxynucleotide pool imbalance, apoptosis, and mutagenesis in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Research* 1994; 54(19):5075-80.
44. Siu MKY in sod: Paradoxical Impact of Two Folate Receptors, FR $\alpha$  and RFC, in Ovarian Cancer: Effect on Cell Proliferation, Invasion and Clinical Outcome. *PLoS One* 2012; 7(11)
45. Jostock T, Knopf HP: Methods for selecting eukaryotic cells expressing a heterologous protein. United States Patent, US8962274 B2, date of patent Feb. 24, 2009
46. Matsue H in ostali: Folate receptor allows cells to grow in low concentrations of 5-methyltetrahydrofolate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; 89(13):6006-9.
47. Ebel W, Routhier E in sod.: Preclinical evaluation of MORAb-003, a humanized monoclonal antibody antagonizing folate receptor-alpha. *Cancer Immunity* 2007; Vol. 7, p. 6
48. Luhrs CA, Raskin CA, Durbin R, in ostali: Transfection of a glycosylated phosphatidylinositol-anchored folate-binding protein complementary DNA provides cells with the ability to survive in low folate medium. *Journal of Clinical Investigation* 1992; 90(3):840-847.
49. Antony AC: The biological chemistry of folate receptors. *Blood* 1992; 79(11):2807-20.

50. Goldman ID, Matherly LH: The cellular pharmacology of methotrexate.  
Pharmacology & Therapeutics 1985; 28(1):77-102