

Экспрессия и секреция рекомбинантного белка LIF человека генетически модифицированными клетками млекопитающих

С. Е. Рымарь, Т. А. Рубан, Д. М. Иродов, В. А. Кордюм

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680

s.y.rymar@imbg.org.ua

Цель работы состояла в получении экспрессии гена LIF человека в генетически модифицированных клетках млекопитающих и изучении секреции рекомбинантного белка этими клетками в культуральную среду. **Методы.** Для выявления рекомбинантного LIF в кондиционированной среде, полученной в результате культивирования клеток, трансфецированных рекомбинантными плазмидами, содержащими ген LIF, использовали Вестерн-блот-анализ и иммунопреципитацию. **Результаты.** Сконструированные рекомбинантные плазмиды обеспечивают экспрессию и секрецию рекомбинантного LIF человека клетками трех линий (CHO-K1, L-M(TK⁻)(ins⁺) и 293T), трансфецированными этими плазмидами. Степень гликозилирования продуцируемого такими клетками рекомбинантного LIF варьирует, при этом наблюдается секреция полностью гликозилированного LIF (с молекулярной массой около 68 кДа). **Выводы.** Кондиционированную среду, полученную вследствие культивирования трансфецированных клеток, можно использовать как источник LIF человека для культивирования клеток, нуждающихся в этом ростовом факторе, и для его выделения в чистом виде.

Ключевые слова: рекомбинантный LIF, экспрессия, секреция, трансфекция, клеточные линии.

Введение. LIF (фактор, угнетающий лейкомию) является полифункциональным цитокином, принадлежащим к семейству IL-6. Он оказывает влияние на различные ткани и типы клеток, включая гемопоэтические клетки, нейральные и мышечные, гепатоциты, адипоциты, остеобласты и остеокласты. LIF действует на пролиферацию герменальных клеток, установление стволовых клеток, играет ключевую роль в имплантации бластоцисты и ранних стадиях беременности, участвует в активации гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси, в развитии гипоталамуса, почек, энергетического гомеостаза и др. [1].

Влияние LIF на основные процессы в клетках организма обуславливает необходимость использо-

вания этого белка как ростового фактора в экспериментах, связанных с культивированием стволовых клеток различного происхождения, а также с их направленной дифференцировкой в клетки разных типов.

LIF, как известно, является абсолютно необходимым компонентом среды для поддержания в плюрипотентном состоянии мышинных эмбриональных стволовых клеток, широко применяемых при изучении механизмов поддержания плюрипотентности и биологии эмбриональной стволовой клетки в целом [2, 3]. Он способствует мультипликации нейральных стволовых клеток человека, обеспечивая их длительное самовосстановление (до 110 удвоений) [4] и сохраняя их мультипотентные свойства в течение года [5], используется в средах

для культивирования мезенхимальных стволовых клеток (МСК), улучшает их остеогенную дифференцировку [6, 7], добавляется в среды для дифференцировки МСК в кардиомиоциты [8, 9] и др. Рекombинантный LIF человека, экспрессируемый в клетках *Escherichia coli*, обладает биологической активностью, индуцируя дифференцировку клеток лейкемической миелоидной линии мыши М1 [10], его используют также в исследованиях *in vitro* и *in vivo*, хотя во втором случае не всегда получают ожидаемые эффекты [11]. Одним из определяющих факторов при этом является гликозилирование рекомбинантных белков. Оно увеличивает стабильность белка и время его жизни в кровяном русле, если речь идет о терапевтических белках, влияет на устойчивость к протеазам, антигенность и специфическую активность [12]. Это вынуждает искать специальные способы повышения уровня гликозилирования рекомбинантных белков в процессе их экспрессии в клетках млекопитающих [13, 14].

При культивировании клеток *in vitro* в среду добавляют очищенные рекомбинантные ростовые факторы, цитокины и другие биологически активные молекулы или используют кондиционированные среды [15, 16]. Инактивация ростовых факторов требует постоянной замены среды, поэтому разрабатывают и другие подходы к обеспечению эффективного микроокружения культивируемых клеток, в частности, используют иммобилизованные ростовые факторы [17] и трансгенные клеточные линии, которые могут служить фидерными клетками [18–20]. Получение трансгенных клеточных линий разного происхождения дает возможность решать ряд задач, связанных, среди прочего, с изучением влияния трансгена на биологию клетки-реципиента. Кроме этого, экспрессия рекомбинантных белков в клетках млекопитающих является основным источником получения гликозилированных белков.

Так, уже к 2007 году около 70 % всех известных терапевтических рекомбинантных белков в мире получены в клетках китайского хомячка (СНО) [21]. Основываясь на значимости LIF для исследований *in vivo* и *in vitro*, целью данной работы стало получение экспрессии рекомбинантного LIF человека в клетках трансгенных клеточных линий мле-

копитающих и изучение его секреции в культуральную среду.

Материалы и методы. В работе использованы плазмиды *pUC28*, *pBluscrII (KS⁺)*, *pEGFP-C1*; штаммы *E. coli* XL1, DH10B; клеточные линии СНО-K1 (китайский хомячок, яичник), L-M(ТК⁻) (*ins⁺*) (мышь, подкожная соединительная ткань), трансфецированная рекомбинантной плазмидой, несущей ген инсулина человека, и 293Т, являющаяся вариантом линии НЕК293 (эмбриональная почка человека), экспрессирующим большой Т-антиген SV40 и устойчивым к G418.

Выделение плазмидных ДНК, обработку их эндонуклеазами рестрикции, лигирование, получение компетентных клеток *E. coli*, анализ рекомбинантных плазмид проводили по стандартным методикам [22].

Для получения кДНК LIF использовали следующие праймеры: 5'-TCTGAGGTTTCCTCCAAGG-3' и 5'-TGCTCAGCTTCATCACAGC-3'; 5'-ATGAA-GGTCTTGGCGGCAGG-3' и 5'-ACCTCCTGCTAG-AAGGCCTG-3'.

кДНК гена *LIF* получали с помощью реакции обратной транскрипции согласно инструкции производителя, используя набор для синтеза кДНК («Fermentas», Литва). ПЦР проводили в стандартных буферных условиях для Taq- и Pfu-полимераз, подбирая оптимальную программу соответственно поставленным задачам.

Эукариотические клетки трансформировали рекомбинантными плазмидами с помощью полиэтиленimina (ПЭИ) [23]. Клетки выдерживали с комплексами ДНК–ПЭИ в течение 1 ч. Селекцию клеток СНО-K1, трансфецированных *pC1-L*, осуществляли на G418 (200 мкг/мл). В случае трансфекции *pC1-IL* клетки отбирали, используя гигромицин (200 мкг/мл). Клетки L-M(ТК⁻)(*ins⁺*) и 293Т трансфецировали только *pC1-IL*, поскольку они устойчивы к G418. Концентрацию антибиотиков, достаточную для селекции резистентных клеток, определяли предварительно.

Экспрессию и секрецию LIF в культуральную среду изучали Вестерн-блот анализом и методом иммунопреципитации. Клетки выращивали на среде ДМЕМ, содержащей 20 % эмбриональной телячьей сыворотки, трижды отмывали средой ДМЕМ

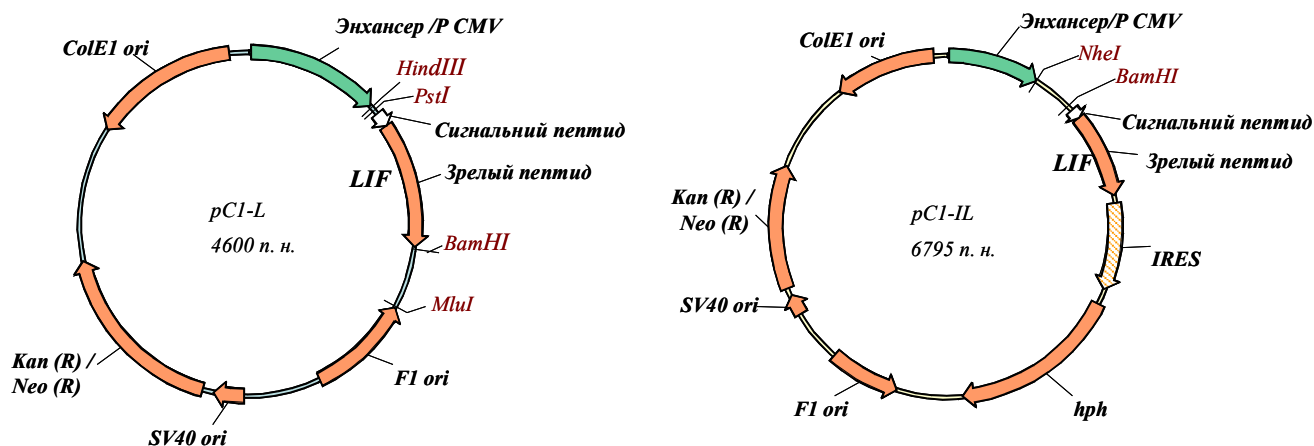


Рис. 1. Физические карты рекомбинантных плазмид

без сыворотки, после чего помещали в такую же среду. Через 1,5–2 сут культуральную среду собирали, белки осаждали 10 %-м раствором ТХУ в присутствии 0,015 % дезоксихолата натрия. После разделения белков в 10 %-м денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ) [24] проводили Вестерн-блот анализ согласно online-протоколу фирмы «Millipore» (США) (millipore.com/immunodetection/id3/westernblotting), используя козы поликлональные антитела против рекомбинантного LIF человека и конъюгат антител к IgG козы, полученных в кролике, с пероксидазой хрена («Sigma», США).

Имунопреципитацию проводили согласно протоколу фирмы «Abcam» (США) (abcam.com/ps/pdf/protocols/immunoprecipitation). Полученную в результате культивирования $2,5 \cdot 10^5$ клеток кондиционированную среду ДМЕМ в объеме 1 мл смешивали с 3 мкг первичных антител и инкубировали в течение 4 ч при перемешивании и температуре 4 °С, после чего добавляли 70 мкл белок G-сефарозы и снова инкубировали с перемешиванием (4 °С, 4 ч). Образцы центрифугировали, удаляли надосадочную жидкость и белок G-сефарозу трижды промывали буфером следующего состава: 50 мМ трис-HCl, pH 8,0, 150 мМ NaCl, 1 % NP-40, 0,1 % SDS. После отмывания к осадку белок G-сефарозы добавляли 25 мкл двукратного буфера для нанесения образцов и кипятили (5 мин). После электрофореза в 10 %-м ПААГ проводили Вестерн-блот анализ.

Результаты и обсуждение. Поскольку цель работы состояла в получении секретируемого в культуральную среду рекомбинантного белка, было

проведено клонирование гена *LIF* человека, кодирующего LIF с сигнальным пептидом. Эту последовательность получили методом ОТ-ПЦР с использованием выделенной из плаценты человека мРНК и соответствующих праймеров. Амплифицированную в ПЦР кДНК *LIF* клонировали в *pBlusScrII* (KS⁺), ее нуклеотидную последовательность подтвердили секвенированием.

Для трансфекции клеток млекопитающих на основе вектора для экспрессии рекомбинантных белков в клетках эукариотов *pEGFP-C1* («Clontech», США) были сконструированы две плазмиды – *pC1-L* и *pC1-IL* (рис. 1). В *pC1-L* ген *LIF* введен под контроль цитомегаловирусного промотора, а в *pC1-IL*, кроме гена *LIF*, встроен фрагмент ДНК, содержащий IRES (внутренний сайт для рибосомы), вируса энцефаломиокардита и ген устойчивости к гигромицину.

Экспрессия гена *LIF* в составе этих конструкций в эукариотических клетках должна приводить к секреции гликозилированного белка. Известно, что LIF имеет шесть сайтов гликозилирования [25] и в зависимости от его степени молекулярная масса (м. м.) белка колеблется от 32 до 73 кДа. Вестерн-блот анализ сред, в которых культивировали клетки трех клеточных линий, трансфицированные рекомбинантными плазмидами со встроенным геном *LIF* человека, показал, что они секретируют LIF, который, по-видимому, в разной степени гликозилирован. Как правило, идентифицировали белки с м. м. около 30, 55 и 68–72 кДа (рис. 2–4). Высокомолекулярная форма, вероятно, соответствует пол-

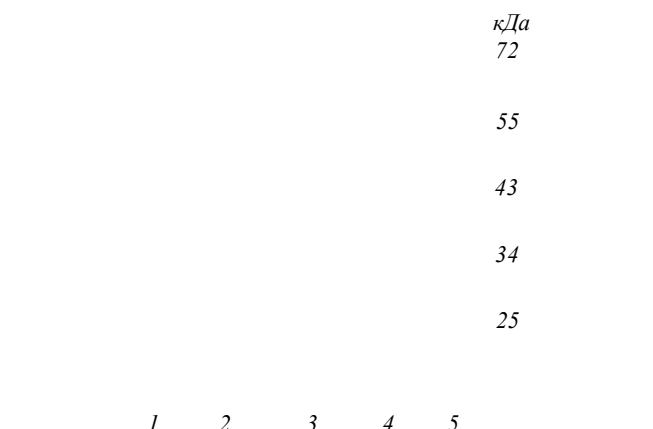


Рис. 2. Вестерн-блот анализ кондиционированных сред (клетки 1-го пассажа): 1 – СНО-К1 (контроль, трансфекция вектором, среда без сыворотки, одни сутки); 2 – СНО-К1 (трансфекция *pCI-L*, среда без сыворотки, одни сутки); 3 – СНО-К1 (контроль, трансфекция вектором, среда без сыворотки, двое суток); 4 – СНО-К1 (трансфекция *pCI-L*, среда без сыворотки, двое суток); 5 – маркер молекулярной массы, кДа

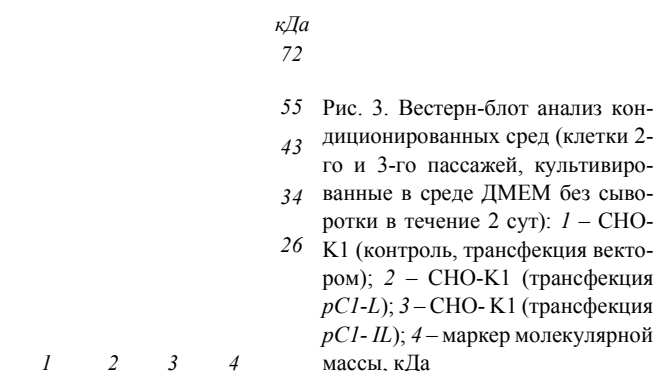


Рис. 3. Вестерн-блот анализ кондиционированных сред (клетки 2-го и 3-го пассажей, культивированные в среде ДМЕМ без сыворотки в течение 2 сут): 1 – СНО-К1 (контроль, трансфекция вектором); 2 – СНО-К1 (трансфекция *pCI-L*); 3 – СНО-К1 (трансфекция *pCI-IL*); 4 – маркер молекулярной массы, кДа

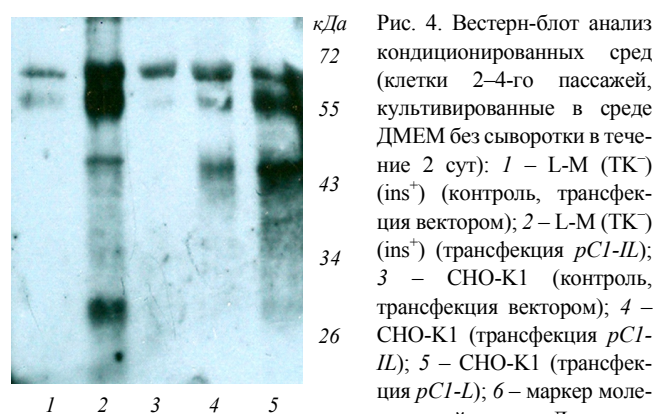


Рис. 4. Вестерн-блот анализ кондиционированных сред (клетки 2–4-го пассажей, культивированные в среде ДМЕМ без сыворотки в течение 2 сут): 1 – L-M (TK⁻) (ins⁺) (контроль, трансфекция вектором); 2 – L-M (TK⁻) (ins⁺) (трансфекция *pCI-IL*); 3 – СНО-К1 (контроль, трансфекция вектором); 4 – СНО-К1 (трансфекция *pCI-IL*); 5 – СНО-К1 (трансфекция *pCI-L*); 6 – маркер молекулярной массы, кДа

ностью гликозилированному белку. Ее визуализации мешает бычий сывороточный альбумин, присутствующий в сыворотке. По этой причине секрецию LIF изучали, культивируя хорошо отмытые от

сыворотки клетки в культуральной среде ДМЕМ, не содержащей сыворотки. В таких условиях через 2–3 суток клетки теряют жизнеспособность, что явно сказывается на эффективности экспрессии клеточных белков, в том числе и рекомбинантного. Лучше всего сохраняется жизнеспособность клеток линии L-M(TK⁻)(ins⁺), продуцирующих инсулин. Кроме этого, поскольку степень гомологии человеческого LIF с мышинным составляет 79 %, в контролях возможно появление положительных сигналов, обусловленных эндогенным LIF. Анализ экспериментальных данных, полученных разными авторами, показывает, что молекулярная масса человеческого LIF, выделенного из разных клеток, отличается. Так, в клетках китайского хомячка экспрессируется рекомбинантный LIF с м. м. около 45 кДа [26]. Из кондиционированной среды клеточной линии карциномы мочевого пузыря 5637 выделен LIF с м. м. 73 кДа [27], другие авторы из этого же источника выделили LIF с м. м. 43 кДа [28], в работе [29] из кондиционированной среды Т-лимфоцитов получен LIF с м. м. 38 кДа.

Для более эффективного концентрирования LIF, секретируемого в среду, применен метод иммунопреципитации с использованием белок G-сэфарозы с последующим Вестерн-блот-анализом преципитата. Результаты, полученные на генетически модифицированных линиях СНО-К1, L-M (TK⁻)(ins⁺) и 293Т, приведены на рис. 5. Исходя из данных Вестерн-блот анализа очевидно, что некоторые формы LIF (м. м. около 30 и 55 кДа), совпадая по подвижности с легкой и тяжелой цепями иммуноглобулинов, внесенных в пробу во время иммунопреципитации, маскируются ими. В иммунопреципитации культуральных сред, полученных после выращивания клеток, трансфицированных векторной плазмидой (без гена *LIF*), интенсивность сигналов, обусловленных легкой и тяжелой цепями иммуноглобулинов, отчетливо слабее. Дополнительно визуализируются интенсивная полоса, соответствующая белку с м. м. 65–68 кДа, которая, по видимому, представляет собой полностью гликозилированную форму LIF, и менее интенсивная полоса, отвечающая белку с м. м. около 48 кДа. Экспрессия в клетках СНО-К1 (рис. 3, 4), трансфицированных *pCI-L*, когда возможна селекция на G418, про-

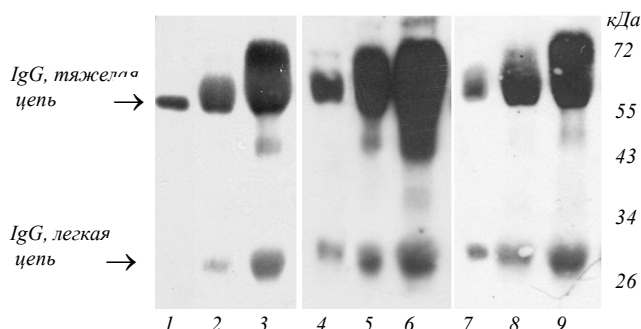


Рис. 5. Определение LIF в кондиционированных средах (иммунопреципитация) (клетки 2–4-го пассажей, культивируемые в среде ДМЕМ без сыворотки в течение 2 сут, кроме L-M(TK⁻)(ins⁺)): 1 – контроль иммунопреципитации (иммунопреципитация без среды); 2 – 293Т (контроль, трансфекция вектором); 3 – 293Т (трансфекция *pC1-IL*); 4 – CHO-K1 (контроль, трансфекция вектором); 5 – CHO-K1 (трансфекция *pC1-IL*); 6 – CHO-K1 (трансфекция *pC1-L*); 7 – L-M(TK⁻)(ins⁺) (контроль, трансфекция вектором); 8 – L-M(TK⁻)(ins⁺) (трансфекция *pC1-IL*, среда без сыворотки, 15 ч); 9 – L-M(TK⁻)(ins⁺) (трансфекция *pC1-IL*, среда без сыворотки, двое суток); 10 – маркер молекулярной массы, кДа

исходит более эффективно, чем в клетках, трансфицированных *pC1-IL*, где селекция осуществляется на гигромицине. При этом клетки линии L-M(TK⁻)(ins⁺), трансфицированные *pC1-IL*, демонстрируют достаточно высокую эффективность экспрессии LIF (в ряде опытов, как и клетки CHO-K1 (рис. 4), трансфицированные *pC1-L*). Вероятно, это объясняется тем, что при отсутствии сыворотки в среде в клетках, продуцирующих инсулин, процессы, обеспечивающие их метаболизм, не угнетаются в такой мере, как в клетках CHO-K1 и 293Т.

Выводы. Сконструированные нами рекомбинантные плазмиды *pC1-L* и *pC1-IL* обеспечивают экспрессию и секрецию рекомбинантного LIF человека в среду из клеток трех трансфицированных ими клеточных линий млекопитающих (двух мышиных и одной человеческой). Продуцируемый такими клетками рекомбинантный LIF гликозилирован в разной степени, в том числе, очевидно, в среде присутствует полностью гликозилированная форма. Среда, кондиционированная генетически модифицированными клетками, может быть использована как источник LIF для выращивания различных клеток, нуждающихся в этом ростовом факторе, а также для выделения его в чистом виде.

Авторы выражают благодарность Е. К. Топоровой за любезно предоставленную клеточную линию L-M(TK⁻)(ins⁺).

S. Yu. Ryman, T. A. Ruban, D. M. Irodov, V. A. Kordium

Expression and secretion of human recombinant LIF by genetically modified mammalian cells

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

Summary

Aim. The aim of this work was to express the human LIF gene in mammalian cells and to study the secretion of recombinant LIF into culture medium. **Methods.** Recombinant LIF was detected by Western blot analysis and immunoprecipitation in culture medium of CHO-K1, L-M(TK⁻)(ins⁺), 293T cells, transfected with recombinant plasmids containing human LIF gene. **Results.** The recombinant plasmids, containing human gene LIF, were constructed. The cells of three (CHO-K1, L-M(TK⁻)(ins⁺), 293T) mammalian lines were transfected with these plasmids. It was shown that the transfected mammalian cells secreted recombinant human LIF which was characterized by variable degree of glycosylation including completely glycosylated form (approximately 68 kD). **Conclusions.** The conditioned medium of developed cell lines can be used as a source of human recombinant LIF for different purposes, including purification of human recombinant LIF and as an additional supplement for cell culturing.

Keywords: recombinant LIF, expression, secretion, transfection, cell lines.

С. Ю. Рима́р, Т. А. Ру́бан, Д. М. Иро́дов, В. А. Кордю́м

Експресія і секреція рекомбінантного білка LIF людини генетично модифікованими клітинами ссавців

Резюме

Мета. Мета роботи полягала в одержанні експресії гена LIF людини в генетично модифікованих клітинах ссавців і вивченні секреції рекомбінантного білка цими клітинами в культуральне середовище. **Методи.** Для визначення рекомбінантного LIF в кондиціонованому середовищі, одержаному в результаті культивування клітин, трансфєкованих рекомбінантними плазмідами, що містять ген LIF, використовували Вестерн-блот аналіз та імунопреципітацію. **Результати.** Сконструйовані рекомбінантні плазмідні забезпечують експресію і секрецію рекомбінантного LIF людини клітинами трьох ліній (CHO-K1, L-M(TK⁻)(ins⁺) і 293Т), трансфєкованих цими плазмідами. Ступінь глікозилювання рекомбінантного LIF, продукованого такими клітинами, варіює, при цьому спостерігається секреція повністю глікозилюваного LIF (з молекулярною масою близько 68 кДа). **Висновки.** Кондиціоноване середовище, одержане внаслідок культивування трансфєкованих клітин, можна використовувати як джерело LIF людини для культивування клітин, яким потрібен цей ростовий фактор, а також для його виділення в очищеному стані.

Ключові слова: рекомбінантний LIF, експресія, секреція, трансфєкція, клітинні лінії.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Auernhammer C. J., Melmed S.* Leukemia inhibitory factor – neuroimmune modulator of endocrine function // *Endocrin. Revs.*–2000.–**21**, N 3.–P. 313–345.
2. *Matsuda T., Nakamura T., Nakao K. T., Katsuki M., Heike T., Yokota T.* STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells // *EMBO J.*–1999.–**18**, N 15.–P. 4261–4269.
3. *Zandstra P. W., Le H. V., Daley G. Q., Griffith L. G., Lauffenburger D. A.* Leukemia inhibitory factor (LIF) concentration modulates embryonic stem cell self-renewal and differentiation independently of proliferation // *Biotechnol. Bioeng.*–2000.–**69**, N 6.–P. 607–617.
4. *Wright L. S., Li J., Caldwell M. A., Wallace K., Johnson J. A., Svendsen C. N.* Gene expression in human neural stem cells: effects of leukemia inhibitory factor // *J. Neurochem.*–2003.–**86**, N 1.–P. 179–195.
5. *Carpenter M. K., Cuib X., Hua Z., Jackson J., Sherman S., Seiger A., Wahlberg L. U.* In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells // *Exp. Neurol.*–1999.–**158**, N 2.–P. 265–278.
6. *Pat. USA 7109032.* Serum-free medium for mesenchymal stem cells / R. Cancedda, B. Dozin // *Publ.* 09/19/2006.
7. *Pat. USA 6432711.* Embryonic stem cells capable of differentiating into desired cell lines / J. H. Dinsmore, J. Ratliff // *Publ.* 8/13/2002.
8. *Pat. USA 7534607.* Method of producing cardiomyocytes from mesenchymal stem cells / W. Chen, S. Lin // *Publ.* 19.05.2009.
9. *Dimaracis I., Levicar N., Nihoyannopoulos P.* In vitro stem cell differentiation into cardiomyocytes: Part I. Culture medium and growth factors // *J. Cardiothor. Renal Res.*–2006.–**1**, N 2.–P. 107–114.
10. *Gearing P. D., Gough N. M., King J. A., Hilton D. J., Nicola N. A., Simpson R. J., Nice E. C., Kelso A., Metcalf D.* Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF) // *EMBO J.*–1987.–**6**, N 13.–P. 3995–4002.
11. *Brinsden P. R., Alam V., De Moustier B., Engrand P.* Recombinant human leukemia inhibitory factor does not improve implantation and pregnancy outcomes after assisted reproductive techniques in women with recurrent for unexplained implantation failure // *Fertil. Steril.*–2009.–**91**, N 4.–P. 1445–1447.
12. *Hossler P., Khattak S. F., Jian Z.* Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture // *Glycobiology.*–2009.–**19**, N 9.–P. 936–949.
13. *Pat. USA 6673575.* Method for preparing polypeptides with appropriate glycosylation / F. Reinhard, E. Horst, W. Claus // *Publ.* 10.06.1999.
14. *Bork K., Horstkorte R., Weidemann W.* Increasing the sialylation of therapeutic glycoproteins: The potential of the sialic acid biosynthetic pathway // *J. Pharmaceut. Sci.*–2009.–**98**, N 10.–P. 3499–3508.
15. *Pat. USA 7118746.* Conditioned cell culture medium compositions and methods of use / G. K. Naughton, D. L. Horwitz, M. A. Applegate, J. Zeltinger, J. N. Mansbridge, A. Kern, L. K. Landeen, A. Ratcliffe, R. E. Pinney // *Publ.* 10.10.2006.
16. *Pat. USA 7723105.* Conditioned cell culture medium, method to obtain the same and use of it for maintenance, proliferation and differentiation of mammalian cells / V. Bordoni, T. Alonzi, M. Tripodi // *Publ.* 5/25/2010.
17. *Makino H., Hasuda H., Ito Y.* Immobilization of leukemia inhibitory factor (LIF) to culture murine embryonic stem cells // *J. Biosci. Bioeng.*–2004.–**98**, N 5.–P. 374–379.
18. *Kameda T., Sugiyama T.* Application of genetically modified feeder cells for culture of keratinocytes // *Meth. Mol. Biol.*–2005.–**289**, N 1.–P. 29–38.
19. *Sidhu K. S., Lie K. H., Tuch B. E.* Transgenic human fetal fibroblasts as feeder layer for human embryonic stem cell lineage selection // *Stem Cells Dev.*–2006.–**15**, N 5.–P. 741–747.
20. *Unger C., Gao S., Cohen M., Jaconi M., Bergstrom R., Holm F., Galan A., Sanchez E., Irion P., Dubuisson J. B., Giry-Latterriere M., Salmon P., Simon C., Hovatta O., Feki A.* Immortalized human skin fibroblast feeder cells support growth and maintenance of both human embryonic and induced pluripotent stem cells // *Hum. Reprod.*–2009.–**24**, N 10.–P. 2567–2581.
21. *Jayapal K. P., Wlaschin K. F., Yap M. G. S., Hu W.-S.* Recombinant protein therapeutics from CHO cells – 20 years and counting // *Chem. Eng. Prog.*–2007.–**103**, N 7.–P. 40–47.
22. *Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E. F.* Molecular cloning: A laboratory manual.–New York: Cold Spring Harbor Lab. publ., 1982.–545 p.
23. *Geisse S., Henke M.* Large-scale transient transfection of mammalian cells: a newly emerging attractive option for recombinant protein production // *J. Struct. Funct. Genomics.*–2005.–**6**, N 2–3.–P. 165–170.
24. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.*–1970.–**227**, N 5259.–P. 680–685.
25. *Schmelzer C. H., Harris R. J., Butler D., Yedinak C. M., Wagner K. L., Burton L. E.* Glycosylation pattern and disulfide assignment of recombinant human differentiation-stimulating factor // *Arch. Biochem. Biophys.*–1993.–**302**, N 2.–P. 484–489.
26. *Schmelzer C. H., Burton L. E., Tamony C. M.* Purification and partial characterization of recombinant human differentiation-stimulating factor // *Protein Exp. Purific.*–1990.–**1**, N 1.–P. 54–62.
27. *Pat. USA 004098.* Leukemia inhibitory factor / N. M. Gough, T. A. Willson, D. Metcalf, D. J. Hilton, E. C. Nice, N. A. Nicola, R. J. Simpson, J. A. King, D. P. Gearing // *Publ.* 02.01.2003.
28. *Gascan H., Aregon I., Praloran V., Naulet J., Godard A., Soullillou J. P., Jacques Y.* Constitutive production of human interleukin for DA cells/leukemia inhibitory factor by human tumor cell lines derived from various tissues // *J. Immunol.*–1990.–**144**, N 7.–P. 2592–2598.
29. *Godard A., Gascan H., Naulet J., Peyrat M. A., Jacques Y., Soullillou J. P., Moreau J. F.* Biochemical characterization and purification of HILDA, a human lymphokine active on eosinophils and bone marrow cells // *Blood.*–1988.–**71**, N 6.–P. 1618–1623.

UDC 571.29 + 57.085.23

Received 21.10.10