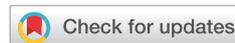


УДК 604.4

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-80-93>

Научная статья | Scientific article



## Увеличение продуктивности клеточной линии-продуцента арилсульфатазы В за счет коэкспрессии формилглицин-генерирующего фермента

С.С. Тимонова , К.А. Смолова, Д.Т. Зарипова, М.С. Пантюшенко, М.А. Королева, Р.Л. Анисимов, Р.А. Хамитов, А.А. Пискунов, В.Н. Бадэ

АО «ГЕНЕРИУМ», ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

 Тимонова Софья Сергеевна; [timonova1993@yandex.ru](mailto:timonova1993@yandex.ru)

### Резюме

Мукополисахаридоз VI типа (синдром Марото–Лами) – орфанное генетическое заболевание, которое связано с дефицитом лизосомального фермента арилсульфатазы В. Актуальность исследования связана с необходимостью разработки высокопродуктивной клеточной линии-продуцента рекомбинантного фермента арилсульфатазы В. Наиболее перспективным подходом представляется создание клеточных линий-продуцентов, коэкспрессирующих целевой фермент арилсульфатазу В и вспомогательный формилглицин-генерирующий фермент на основе клеточной линии CHO. При этом большое практическое значение имеет возможность культивирования клеточных линий-продуцентов в виде суспензии, без использования сыворотки или других компонентов животного происхождения. **Цель работы:** разработка высокопродуктивных клеточных линий-продуцентов рекомбинантного фермента арилсульфатазы В за счет коэкспрессии вспомогательного формилглицин-генерирующего фермента. **Материалы и методы:** использовали суспензионную клеточную линию CHO. Трансфекцию клеток CHO проводили методом электропорации с использованием системы MaxCyte STX. Моноклональные клеточные линии получали с использованием системы Cell Metric. Концентрацию арилсульфатазы В в культуральной жидкости определяли методом иммуноферментного анализа. Образцы культуральной жидкости анализировали с применением электрофореза в полиакриламидном геле и вестерн-блота. Уровень мРНК измеряли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. **Результаты:** получены клеточные линии-продуценты, коэкспрессирующие целевой фермент арилсульфатазу В и вспомогательный формилглицин-генерирующий фермент. Достигнуто увеличение выхода активного целевого фермента арилсульфатазы В с 2 до 100 мг/л за счет подбора оптимального соотношения плазмид во время трансфекции. Наибольший выход целевого фермента арилсульфатазы В наблюдался при соотношении плазмид, кодирующих гены арилсульфатазы В и формилглицин-генерирующего фермента, равном 90:10 (%). **Выводы:** разработаны высокопродуктивные клеточные линии-продуценты рекомбинантного фермента арилсульфатазы В, коэкспрессирующие целевой и вспомогательный ферменты. Коэкспрессия арилсульфатазы В и формилглицин-генерирующего фермента приводит к улучшению ростовых и продукционных характеристик клеточной линии, что, по-видимому, обусловлено модификацией активного центра целевого фермента арилсульфатазы В. Полученные результаты позволят решить проблему низкого выхода фермента, характерную для препаратов подобного класса.

**Ключевые слова:** культура клеток CHO; арилсульфатаза В; галсульфаза; ген *ARSB*; лизосомальный фермент; сульфатаза; мукополисахаридоз VI типа; формилглицин-генерирующий фермент

© С.С. Тимонова, К.А. Смолова, Д.Т. Зарипова, М.С. Пантюшенко, М.А. Королева, Р.Л. Анисимов, Р.А. Хамитов, А.А. Пискунов, В.Н. Бадэ, 2022

**Для цитирования:** Тимонова С.С., Смолова К.А., Зарипова Д.Т., Пантюшенко М.С., Королева М.А., Анисимов Р.Л., Хамитов Р.А., Пискунов А.А., Бадэ В.Н. Увеличение продуктивности клеточной линии-продуцента арилсульфатазы В за счет коэкспрессии формилглицин-генерирующего фермента. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(1):80–93. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-80-93>

---

## Increasing productivity of arylsulfatase B-producing cell line by coexpression of formylglycine-generating enzyme

S.S. Timonova ✉, K.A. Smolova, D.T. Zaripova, M.S. Pantyushenko, M.A. Koroleva, R.L. Anisimov, R.A. Khamitov, A.A. Piskunov, V.N. Bade

JSC "GENERIUM", 14 Vladimirskaia St., Volginsky town, Petushinskiy District, Vladimir Region 601125, Russian Federation

✉ Sofia S. Timonova; [timonova1993@yandex.ru](mailto:timonova1993@yandex.ru)

---

### Abstract

Mucopolysaccharidosis type VI (Maroteaux–Lamy syndrome) is an orphan genetic disease caused by deficiency of the lysosomal enzyme arylsulfatase B (ASB). The need to develop a highly productive cell line for the production of recombinant ASB, is behind the concept and relevance of this study. The most promising approach seems to be the development of CHO producer cell lines coexpressing the target ASB enzyme and an auxiliary formylglycine-generating enzyme (FGE). At the same time, it is important from a practical perspective to have the possibility of cultivating producer cell lines as suspensions free of serum or other components of animal origin. **The aim of the study** was to develop highly productive cell lines for the production of recombinant ASB by coexpression of the auxiliary FGE. **Materials and methods:** a suspension CHO cell line was used in the study. CHO cells were transfected by electroporation using the MaxCyte STX system. Monoclonal cell lines were obtained with the help of the Cell Metric system. Enzyme-linked immunosorbent assay was used for determination of ASB concentration in the culture fluid. Culture fluid samples were analysed using polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting. The mRNA level was measured by real-time polymerase chain reaction. **Results:** producer cell lines coexpressing the target ASB enzyme and auxiliary FGE were obtained. An increase in the yield of the active target ASB enzyme from 2 to 100 mg/L was achieved by selecting the optimal ratio of plasmids during transfection. The highest yield of the target ASB enzyme was achieved at the 90:10 ratio (%) of plasmids encoding the ASB and FGE genes, respectively. **Conclusions:** the authors developed highly productive cell lines for the production of recombinant ASB, which coexpress the target and auxiliary enzymes. The coexpression of ASB and FGE improves the growth and production characteristics of the cell line, probably due to the modification of the ASB active site. The obtained results will help resolve the problem of low enzyme yield, which is typical of this class of medicines.

---

**Key words:** CHO cell line; arylsulfatase B; galsulfase; *ARSB* gene; lysosomal enzyme; sulfatase; mucopolysaccharidosis type VI; formylglycine-generating enzyme

**For citation:** Timonova S.S., Smolova K.A., Zaripova D.T., Pantyushenko M.S., Koroleva M.A., Anisimov R.L., Khamitov R.A., Piskunov A.A., Bade V.N. Increasing productivity of arylsulfatase B-producing cell line by coexpression of formylglycine-generating enzyme. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(1):80–93. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-80-93>

---

## Введение

Мукополисахаридоз (МПС) представляет собой группу из 11 типов орфанных генетических заболеваний, каждый тип МПС характеризуется мутацией определенного гена, кодирующего тот или иной лизосомальный фермент, дисфункция которого влияет на один из этапов деградации гликозаминогликанов (ГАГ) в клетке<sup>1</sup> [1–3], что приводит к постепенному накоплению нерасщепленных продуктов метаболизма в тканях и органах [4].

МПС VI типа передается по аутосомно-рецессивному типу наследования и вызван мутациями в гене *ARSB*, который кодирует лизосомальный фермент N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазу (арилсульфатаза В, галсульфаза, ASB, EC 3.1.6.12), что приводит к снижению/отсутствию активности фермента [5]. Заболевание проявляется грубыми чертами лица, задержкой роста, выраженными деформациями костей и суставов, нарушениями нервной системы и другими симптомами [6]. Для больных МПС VI типа рекомендована заместительная ферментная терапия препаратом Наглазим (BioMarin, США) [7–9], который представляет собой рекомбинантный лизосомальный фермент галсульфазу.

Большинство известных арилсульфатаз [10, 11], в том числе и ASB [12], претерпевают уникальную посттрансляционную модификацию в активном центре [13, 14], приводящую к трансформации каталитического остатка цистеина (Cys) до остатка α-формилглицин-(fGly) [15–17], что необходимо для проявления сульфатазной активности фермента. В организме активный фермент ASB катализирует отщепление сульфатных групп молекул ГАГ [18]: дерматансульфатов и гепарансульфатов [19, 20].

Образование fGly в активном центре ASB катализируется формилглицин-генерирующим ферментом<sup>2</sup> (FGE, EC 1.8.3.7) [21, 22]. Белок FGE локализуется в эндоплазматическом ретикулуме, где взаимодействует с вновь синтезированными сульфатазами и катализирует превращение Cys в fGly в активном центре фермента [23–25].

В результате предварительных работ, проведенных авторами, были получены клеточные линии-продуценты на основе суспензионной линии клеток CHO с уровнем выхода рекомбинантного фермента ASB 1–2 мг/л.

Цель работы — разработка высокопродуктивных клеточных линий-продуцентов рекомбинантного фермента арилсульфатазы В за счет коэкспрессии вспомогательного формилгли-

цин-генерирующего фермента. Для выполнения цели были поставлены следующие задачи: получение суспензионной моноклональной клеточной линии-продуцента ASB путем трансфекции клеток линии CHO плазмидой, несущей ген фермента ASB, с последующим получением клонов с помощью системы клеточной визуализации Cell Metric; получение суспензионной клеточной линии-продуцента, экспрессирующей оба фермента ASB и FGE (продуцент ASB+FGE), путем проведения дополнительной трансфекции линии-продуцента ASB плазмидой с геном, кодирующим вспомогательный белок FGE; оценка ростовых характеристик и продуктивности клеточных линий-продуцентов; оценка экспрессии гена ASB по уровню мРНК в клетках полученных линий-продуцентов; подбор оптимального соотношения плазмид, кодирующих целевой и вспомогательный ферменты, при получении высокопродуктивных клеточных линий-продуцентов ASB+FGE (минипулы-продуценты ASB+FGE).

## Материалы и методы

### Материалы

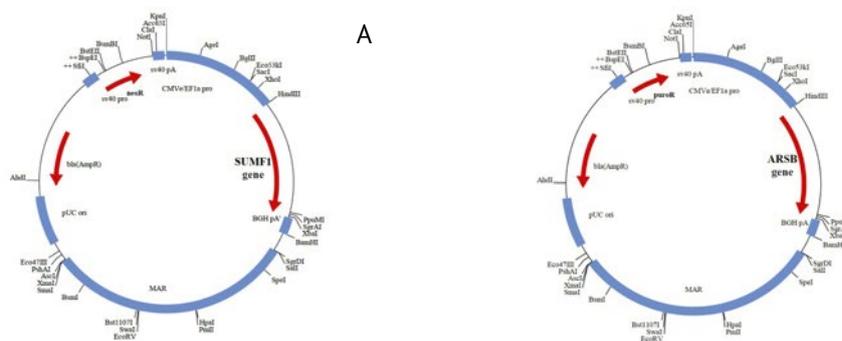
Культура клеток яичников китайского хомячка (CHO) (получена из коллекции клеточных культур НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИгенетика); среда для культивирования BalanCD Growth A (BCD) (FujiFilm, США); набор для экстракции РНК RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия); буфер для электропорации MaxCyte (HyClone, США); поликлональные крысиные антитела против арилсульфатазы В (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия); детектирующие крысиные антитела против арилсульфатазы В, конъюгированные с пероксидазой хрена (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия); в качестве маркера молекулярной массы белков использовали Prestained Protein Ladder, 10–180 kDa (Thermo Scientific, США); среда для замораживания клеток Vambanker (Wako Chemicals, США); 4-метилумбеллиферил-сульфат-калиевой соли (Sigma, Япония); 4-метилумбеллиферон (Sigma, Япония).

### Методы

**Экспрессионные векторы с генами, кодирующими арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент.** Синтетические кодон-оптимизированные последовательности генов ферментов ASB и FGE (кодирующая нуклеотидная последовательность с фланкирующими сайтами рестрикции) были клонированы

<sup>1</sup> <https://www.genome.jp/entry/K01135>

<sup>2</sup> <https://www.uniprot.org/uniprot/Q8NBK3>



**Рис. 1.** Реконбинантные экспрессионные векторы, кодирующие последовательности ASB (A) и FGE (B) человека. ARSB gene – ген фермента арилсульфатазы B; SUMF1 gene – ген формилглицин-генерирующего фермента; BGH pA – сигнал полиаденилирования соматотропина быка; MAR – стабилизирующая эухроматин последовательность; pUC ori – начало репликации; bla (AmpR) – бета-лактамаза, ген устойчивости к ампициллину; sv40pro – ранний промотор вируса SV40; sv40 pA – сайт полиаденилирования SV40; puroR – ген устойчивости к антибиотику пурамицину; NeoR – ген устойчивости к антибиотику неомицину; CMVe/EF1a pro – гибридный промотор, состоящий из энхансера вируса CMV и промотора транскрипции гена фактора элонгации.

**Fig. 1.** Recombinant expression vectors encoding human ASB (A) and FGE (B) sequences. ARSB gene—gene encoding the arylsulfatase B enzyme; SUMF1 gene—gene encoding the formylglycine-generating enzyme; BGH pA—bovine growth hormone polyadenylation signal; MAR—euchromatin stabilising sequence; pUC ori—the origin of replication; bla (AmpR)—beta-lactamase, ampicillin resistance gene; sv40pro—early promoter of the SV40 virus; sv40 pA—SV40 polyadenylation signal; puroR—puromycin resistance gene; neoR—neomycin resistance gene; CMVe/EF1a pro—hybrid promoter consisting of the CMV enhancer and the transcription promoter of the elongation factor gene.

для экспрессии в клетках CHO в экспрессионные векторы с разными селективными маркерами (рис. 1). Экспрессия генов находилась под контролем гибридного CMVe/EF1alpha промотора.

**Суспензионное культивирование клеток линии CHO.** Клетки линии CHO были адаптированы к суспензионному культивированию в среде, не содержащей сыворотку или другие компоненты животного происхождения. Клетки линии CHO культивировали в среде BCD при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> и влажности более 75% в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Sanyo, Япония).

**Расчет ростовых характеристик клеточных культур.** Плотность жизнеспособных клеток (VCD, viable cell density), жизнеспособность культуры клеток определяли с помощью автоматического счетчика клеток Countess II FL Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific, США). Кумулятивную клеточную плотность (CCD) [26, 27] вычисляли по формуле (1):

$$CCD_2 = 0,5 \times (VCD_0 + VCD_1) \times \frac{T}{24} + CCD_1, (1)$$

где CCD<sub>2</sub> – кумулятивная клеточная плотность в день отбора пробы (×10<sup>6</sup> клеток×сут/мл); CCD<sub>1</sub> – кумулятивная клеточная плотность предыдущего дня отбора пробы (×10<sup>6</sup> клеток×сут/мл); T – время (ч), прошедшее между настоящей и предыдущей точкой отбора пробы в процессе культивирования; VCD<sub>0</sub> – начальная плотность жизнеспособных клеток (×10<sup>6</sup> клеток/мл); VCD<sub>1</sub> – конечная плотность жизнеспособных клеток (×10<sup>6</sup> клеток/мл).

Удельную продуктивность клеточных культур (Q<sub>p</sub>), выраженную в пг/(клетка×сут), вычисляли по формуле (2):

$$Q_p = \frac{(p_1 - p_0) / (VCD_0 + VCD_1) \times 0,5}{\text{Сутки}}, (2)$$

где p<sub>1</sub> – продуктивность в день пересева (мг/л); p<sub>0</sub> – продуктивность в нулевой день (в нашем случае начальное значение равно нулю); VCD<sub>0</sub> – начальная плотность жизнеспособных клеток (в нашем случае начальная плотность равна 0,3×10<sup>6</sup> клеток/мл); VCD<sub>1</sub> – конечная плотность жизнеспособных клеток в день пересева (×10<sup>6</sup> клеток/мл). Сутки – число суток культивирования. Уровень продуктивности клеточных культур устанавливали, определяя концентрацию ASB (мг/л) в культуральной жидкости методом ИФА.

**Трансфекция клеток линии CHO методом электропорации.** Клетки линии CHO были трансфицированы плазмидой, несущей ген фермента ASB, или двумя плазмидами, кодирующими гены ферментов ASB и FGE (рис. 1). За сутки до трансфекции клетки засеивали с плотностью 1,0×10<sup>6</sup> клеток/мл для достижения логарифмической фазы роста. Перед трансфекцией определяли плотность клеток и жизнеспособность культуры клеток, после чего отбирали 2,0×10<sup>8</sup> клеток, промывали с помощью стерильного фосфатно-буферного раствора (PBS) и осаждали центрифугированием при 180 g в течение 5 минут. Клеточный осадок ресуспендировали

в 1 мл буфера для электропорации. В клеточную суспензию вносили плазмидную ДНК (20 мкг) и проводили электропорацию клеток в камерах ОС-100 с использованием системы для трансфекции MaxCyte STX (MaxCyte, США) [28]. В случае котрансфекции клеток линии CHO плазмидами, кодирующими гены ферментов ASB и FGE, плазмиды вносили в соотношениях, равных 50:50; 66,6:33,3; 90:10 (%).

**Получение минипулов.** Трансфицированные клетки высевали в концентрации  $5,0 \times 10^4$  клеток/мл в плоскостонные 96-луночные планшеты по 100 мкл/луночку в среде BCD с селективными антибиотиками (5 мг/л пурамицина и/или 500 мг/л неомидина). Всего для высевания трансфицированных клеток было использовано тридцать планшетов. Гетерогенные клеточные линии, продуцирующие целевой фермент (минипулы), культивировали в стационарных условиях в течение 18 суток при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 70%. Затем проводили скрининг по продуктивности минипулов из 96-луночных планшетов, после чего минипулы с самой высокой продуктивностью переводили в больший объем 6-луночных планшетов. Далее проводили скрининг минипулов из 6-луночных планшетов, после чего переводили минипулы с максимальной продуктивностью в колбы для адаптации роста.

**Криоконсервация клеток.** После подсчета и определения жизнеспособности культур клеток суспензию клеток осаждали центрифугированием при 180 g в течение 5 минут, супернатант удаляли, к осадку клеток добавляли бессывороточную среду для замораживания клеток Vambanker (Wako Chemicals, США). Клетки минипулов и/или клонов замораживали по  $1,0 \times 10^7$  клеток/мл.

**Иммуноферментный анализ.** Для определения концентрации рекомбинантного фермента ASB в культуральной жидкости (продуктивность, мг/л) проводили непрямой неконкурентный гетерогенный иммуноферментный анализ (ИФА)<sup>3</sup> в 96-луночных планшетах Medi-sorb Microplates (Nunc, Дания). Для селективной сорбции ASB из культуральной жидкости использовали поликлональные крысиные антитела anti-ASB (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия), 5 мг/л. В качестве детектирующих антител использовали крысиные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена anti-ASB-HRP (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия), 5 мг/л. В качестве стандарта использовали препарат рекомбинантной галсульфазы Наглазим (BioMarin, США). Измерения проводи-

ли на спектрофотометре Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, США).

**Получение клонов-продуцентов арилсульфатазы В.** Минипул, экспрессирующий ASB, был клонирован методом предельного разведения в среде BCD в 96-луночные планшеты с концентрацией 5 клеток/мл. Планшеты с растущими клонами клеток инкубировали в стационарных условиях в течение 10 суток при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 70% влажности. Для отслеживания роста клонов клеток использовали высококонтрастную систему клеточной визуализации Cell Metric (Solentim, Великобритания).

**Периодическое культивирование клеток.** Культивирование культур клеток проводили в биореакторе TubeSpin Bioreactor 50 (TPP Techno Plastic Products AG, Швейцария). Посевная концентрация клеток составляла  $0,3 \times 10^6$  клеток/мл, в качестве питательной среды использовали 25 мл BCD. Культивирование клеток проводили в условиях 5% CO<sub>2</sub> и 37 °С при 200 об/мин на шейкере-инкубаторе Climo-Shaker ISF1-XC Kuhner (Kuhner, Германия). Процесс культивирования останавливали на 6 или 7 сутки, когда жизнеспособность продуцентов снижалась.

**Измерение активности арилсульфатазы В.** В основе метода оценки активности ASB лежит способность фермента отщеплять сульфатные остатки от молекулы субстрата – 4-метилумбеллиферил-сульфата-калиевой соли (Sigma, Япония). В результате реакции образуется флуоресцирующий продукт – 4-метилумбеллиферон. Уровень флуоресценции продукта реакции и стандартного раствора 4-метилумбеллиферона (Sigma, Япония) измеряли при 365/460 нм с помощью фотометра Synergy HTX (BioTek, США). Единицей активности ASB считали количество фермента, способного катализировать расщепление 1 мкмоль субстрата 4-метилумбеллиферил-сульфата-калиевой соли при 37 °С, pH 4,9–5,1, в течение 1 мин. Активность ASB в испытуемых образцах (А), выраженную в ЕД/мл, вычисляли по формуле (3):

$$A = \frac{(F_{\text{обр}} - F_{\text{сравн}}) \times 1 \times D}{30 \times 0,05 \times 1000}, \quad (3)$$

где  $F_{\text{обр}}$  – количество 4-метилумбеллиферона, образованное в реакционной смеси с испытуемыми образцами, вычисленное относительно калибровочного графика (нмоль);  $F_{\text{сравн}}$  – количество 4-метилумбеллиферона, образованное в реакционной смеси с раствором сравнения, вычисленное относительно калибровочного

<sup>3</sup> Alhaji M, Farhana A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>

**Таблица 1.** Пары праймеров и их последовательности, используемые для анализа ПЦР в реальном времени  
**Table 1.** Primer pairs and sequences used for real-time PCR analysis

Праймер <i>Primer</i>	Последовательность <i>Sequence</i>
ARSB for	GCCCTGATCACCAACCAC
ARSB rev	GGGCTTCAGGTACTCCTC
Fkbp1a for	CTCTCGGGACAGAAACAAGC
Fkbp1a rev	GACCTACACTCATCTGGGCTAC
Tmed2 for	GCCACATGGATGGGACATAC
Tmed2 rev	TGATGAGCTTCTGTCTCCATGTC

графика (нмоль);  $D$  – фактор разведения испытуемых образцов; 30 – время реакции (мин); 0,05 – объем разведенного испытуемого образца, внесенного в лунку (мл); 1000 – коэффициент пересчета единиц измерения.

**Количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.** Количественную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени использовали для оценки экспрессии гена ASB. РНК экстрагировали из  $10 \times 10^6$  клеток CHO с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции фирмы-производителя. Далее из выделенной мРНК методом обратной транскрипции получали кДНК с использованием системы синтеза SuperScript® IV (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя, используя случайные гексамеры в качестве праймеров. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе iCycler (Bio-rad, США) с использованием реакционной смеси qPCR mix-HS HighROX (Евроген, Россия) согласно инструкции фирмы-производителя. Все значения были нормированы на уровни генов домашнего хозяйства Fkbp1a и Tmed2 с использованием метода  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [29]. Данные ПЦР в реальном времени анализировали с помощью программы QBase+<sup>4</sup>. Пары праймеров и их последовательности, используемые для анализа ПЦР в реальном времени, указаны в таблице 1.

**Приготовление лизатов клеток минипулов.** Суспензию клеток ( $2 \times 10^6$  клеток/мл) осаждали центрифугированием при 500 g в течение 5 минут, супернатант удаляли, осадок клеток промывали в 1,0 мл PBS. После промывки клетки осаждали центрифугированием при 500 g в течение 5 минут, супернатант удаляли и клетки ресуспендировали в 100 мкл денатурирующего буфера, содержащего додецилсульфат натрия

и 2-меркаптоэтанол, после чего прогревали в течение 5 минут при 95 °C.

**Приготовление проб культуральной жидкости для электрофореза.** Культуральную жидкость отделяли от суспензии клеток центрифугированием при 500 g в течение 5 минут, после чего каждый образец разводили в денатурирующем буфере с 2-меркаптоэтанолом и нагревали 5 минут при 95 °C. Образцы подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Для визуализации белков в гель добавляли трихлорэтанол [30]. В качестве маркера молекулярной массы белков использовали Prestained Protein Ladder, 10–180 kDa (Thermo Scientific, США).

**Вестерн-блот.** После проведения электрофореза осуществляли перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану. Затем мембрану инкубировали в блокировочном растворе 2% бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США) и переносили в раствор крысиных поликлональных антител к ASB (1:2000, АО «ГЕНЕРИУМ», Россия) в течение 1 часа. Далее мембрану отмывали в PBS с добавлением Твина 20 (PBS-T) и переносили в раствор кроличьих антител P-RAQ Iss (1:5000, ИМ-ТЕК, Россия) в течение 1 часа. После инкубации мембрану отмывали в PBS-T и наносили проявочный раствор ECL Western Blotting (Bio-rad, США). Сигнал детектировали при помощи системы ChemiDoc XRS+Molecular Imager и программного обеспечения Image Lab, Version 3.0 (Bio-rad, США). В случае окрашивания лизатов использовали следующую пару антител, детектирующих вспомогательный FGE: поликлональные кроличьи антитела (Abcam, Великобритания) и ослиные антитела к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (GE Healthcare Life Sciences, США).

<sup>4</sup> <https://www.qbaseplus.com>

**Хроматографическая очистка арилсульфатазы В.** Хроматографическую очистку ASB проводили с использованием системы AKTA avant (GE Healthcare). Для этого культуральную жидкость, содержащую целевой белок, сорбировали на колонку Tricorn 10/50 объемом 4 мл (Cytiva, Австрия) с аффинно связывающим гликозилированные белки конканавалином А (ConA sepharose, Cytiva, Швеция), после чего промывали десятикратным объемом промывочного буфера (20 мМ HEPES; 0,5 М хлорид натрия; 1 мМ хлорид кальция; 1 мМ хлорид марганца; pH 7,1). Белок элюировали раствором, содержащим 20 мМ HEPES; 0,3 М метил- $\alpha$ -D-маннопиранозид; pH 7,1. Вторую стадию очистки проводили с использованием металл-хелатного сорбента IMAC sepharose FF (Cytiva, Швеция), предварительно насыщенного ионами двухвалентной меди. Колонку HiTrap, объем 1 мл (Cytiva, Австрия), уравнивали стартовым буфером (20 мМ натрий-фосфатный буферный раствор; 0,5 М хлорид натрия; pH 7,0) после чего наносили элюат с предыдущей стадии (объем 24 мл). Связанный белок промывали десятикратным объемом стартового буфера и затем элюировали буфером, содержащим 150 мМ имидазола (pH 6,0). Для третьей, финальной стадии очистки применялся катионообменный сорбент SP sepharose (Cytiva, Швеция). При нанесении элюат с предыдущей стадии (объем 5 мл) добавляли буфером (10 мМ натрий-ацетатный буферный раствор; pH 4,5) в три раза и наносили на уравновешенную (20 мМ натрий-ацетатный буферный раствор; pH 4,5) колонку (HiTrap, объем 1 мл). Целевую фракцию белка элюировали в линейном градиенте хлорид-ионов (10 мМ натрий-фосфатный буферный раствор; 0,5 М хлорид натрия; pH 5,8). Концентрацию белка определяли по оптическому поглощению при 280 нм, используя в качестве коэффициента удельный показатель поглощения раствора целевого белка с концентрацией 1 мг/мл, равный 1,97. Выход белка составил 80 и 90% на второй и третьей стадиях очистки соответственно.

**Статистическая обработка результатов** была выполнена с использованием программы Graph Pad Prism 6. Применяли однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA тест) или *t*-критерий Стьюдента. Данные представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения (SD); обозначали достоверность отличий: \*  $p_{\text{values}} < 0,05$ , \*\*  $p_{\text{values}} < 0,01$ , \*\*\*  $p_{\text{values}} < 0,001$ , \*\*\*\*  $p_{\text{values}} < 0,0001$  или ns – нет статистической разницы.

## Результаты и обсуждение

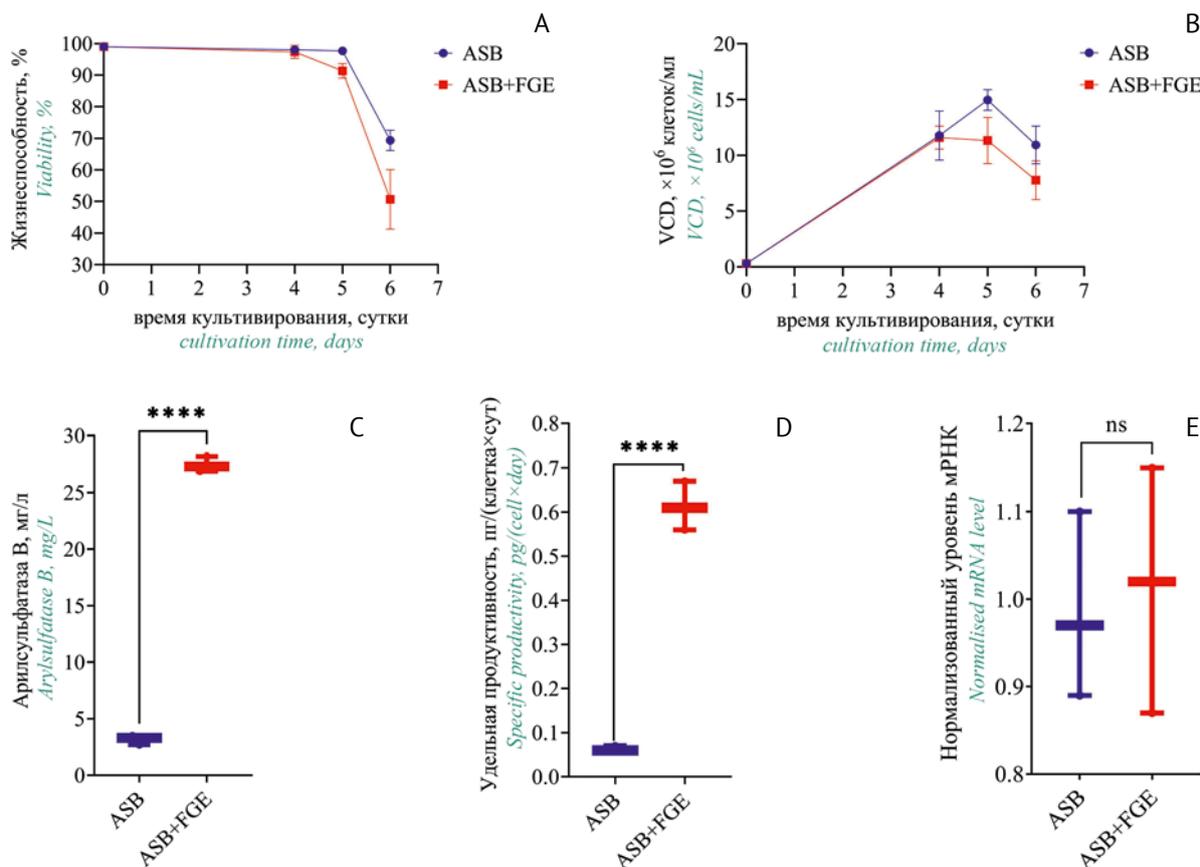
### **Увеличение продуктивности клона-продуцента арилсульфатазы В за счет коэкспрессии вспомогательного формилглицин-генерирующего фермента**

Клетки линии CHO трансфицировали плазмидой, несущей ген фермента ASB, с дальнейшим получением суспензионной моноклональной клеточной линии-продуцента ASB с использованием системы Cell Metric. Для изучения влияния FGE на экспрессию и активность ASB, была проведена трансфекция клона-продуцента ASB плазмидой, несущей ген вспомогательного фермента FGE, который участвует в посттрансляционной модификации активного центра ASB. Полученную клеточную линию, экспрессирующую оба фермента ASB+FGE (продуцент ASB+FGE), сравнивали с исходным клоном-продуцентом ASB.

В ходе сравнительного культивирования наблюдали значительное увеличение выхода фермента и удельной продуктивности клеточной линии, экспрессирующей оба фермента ASB+FGE, по сравнению с исходным клоном-продуцентом, экспрессирующим только фермент ASB (рис. 2С, 2D). Продуктивность исходного клона-продуцента ASB составила 3–5 мг/л, а продуктивность продуцента, коэкспрессирующего ASB+FGE, – 25 мг/л (рис. 2С). Существенных различий ростовых характеристик у данных клеточных линий не наблюдали (рис. 2А, 2В).

Наличие экспрессии экзогенного FGE у продуцента, экспрессирующего ферменты ASB+FGE, было подтверждено результатами вестерн-блот анализа клеточных лизатов, поскольку известно, что фермент FGE локализован в эндоплазматическом ретикулуме [21], где участвует в посттрансляционной модификации активного центра ASB (рис. 3С, 3D). Было показано, что уровень экзогенного FGE в клетках продуцента, коэкспрессирующего ASB+FGE, значительно выше (наличие видимого сигнала рис. 3D, дорожки 5–7), чем в клетках исходного клона-продуцента ASB (ниже предела детекции на рис. 3D, дорожки 2–4). Специфическое окрашивание экзогенного FGE у клона-продуцента ASB+FGE подтверждает тот факт, что коэкспрессия двух ферментов приводит к повышению выхода целевого белка ASB (рис. 3А, 3В, дорожки 5–7).

Для оценки влияния экспрессии экзогенного FGE на уровень мРНК гена ASB была проведена количественная ПЦР в реальном времени. В результате было показано, что уровни мРНК гена ASB у клеток исходного клона-продуцента ASB и клеток продуцента, коэкспрессирующе-



**Рис. 2.** Характеристики клона-производителя ASB после котрансфекции плазмидой с геном, кодирующим вспомогательный белок FGE. А – жизнеспособность клеток (%); В – плотность жизнеспособных клеток, VCD ( $\times 10^6$  клеток/мл); С – продуктивность (мг/л); D – удельная продуктивность клеток (пг/(клетка $\times$ сут)); E – нормализованный уровень мРНК. Обозначения на рисунке: ASB – клон-производитель ASB; ASB+FGE – производитель, коэкспрессирующий ферменты ASB и FGE.  $p_{\text{values}}$  рассчитывали с помощью теста one-way ANOVA, используя в качестве контроля группу ASB (\*  $p_{\text{values}} < 0,05$ , \*\*  $p_{\text{values}} < 0,01$ , \*\*\*  $p_{\text{values}} < 0,001$ , \*\*\*\*  $p_{\text{values}} < 0,0001$ ; ns – нет статистической разницы).

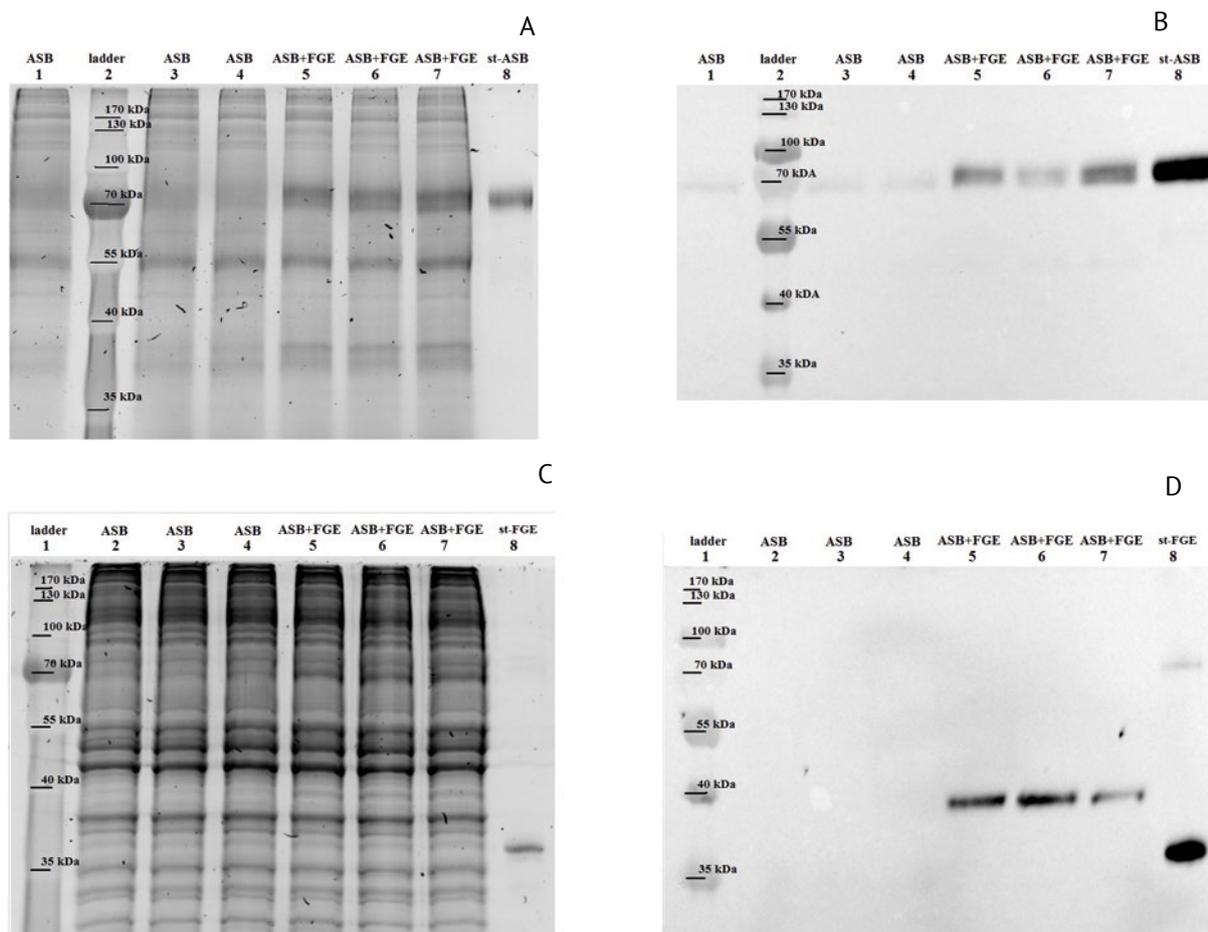
**Fig. 2.** Characteristics of the ASB-producing clone after cotransfection with a plasmid carrying the gene encoding the auxiliary FGE protein. A–cell viability (%); B–viable cell density, VCD ( $\times 10^6$  cells/mL); C–productivity (mg/L); D–specific productivity (pg/(cell $\times$ day)); E–normalised mRNA level. Symbols used in the figure: ASB–ASB-producing clone; ASB+FGE–producer coexpressing ASB and FGE enzymes.  $p_{\text{values}}$  were calculated by one-way ANOVA using the ASB group as control (\*  $p_{\text{values}} < 0.05$ , \*\*  $p_{\text{values}} < 0.01$ , \*\*\*  $p_{\text{values}} < 0.001$ , \*\*\*\*  $p_{\text{values}} < 0.0001$ , ns–no statistical difference).

го ASB+FGE, не различаются (рис 2E). При этом, как было показано ранее, уровень экспрессии секретируемого целевого фермента ASB в культуральную жидкость у этих клеточных линий отличается значительно (рис. 2C).

По совокупности полученных экспериментальных данных можно предположить следующий механизм увеличения продуктивности линии-производителя ASB за счет коэкспрессии вспомогательного белка FGE. В случае клона-производителя ASB, трансфицированного только одной плазмидой, кодирующей ген фермента ASB, в клеточной линии CHO наблюдается низкий уровень экспрессии эндогенного фермента FGE, из-за чего в клетках не может быть достигнут достаточный уровень посттрансляционной модификации фермента ASB, что при-

водит к неправильному фолдингу, низкой стабильности и частичному протеолизу фермента и, как следствие, низкому уровню его секреции клетками. В случае клона-производителя ASB, дополнительно трансфицированного плазмидой, кодирующей ген вспомогательного фермента FGE, по-видимому, происходит на достаточном уровне модификация активного центра целевого фермента ASB, катализируемая вспомогательным ферментом FGE, что обеспечивает правильный фолдинг, стабильную конфигурацию, функциональную активность ASB и способствует высокому уровню секреции фермента в культуральную жидкость.

Таким образом, с помощью коэкспрессии вспомогательного белка FGE, участвующего в посттрансляционной модификации активного

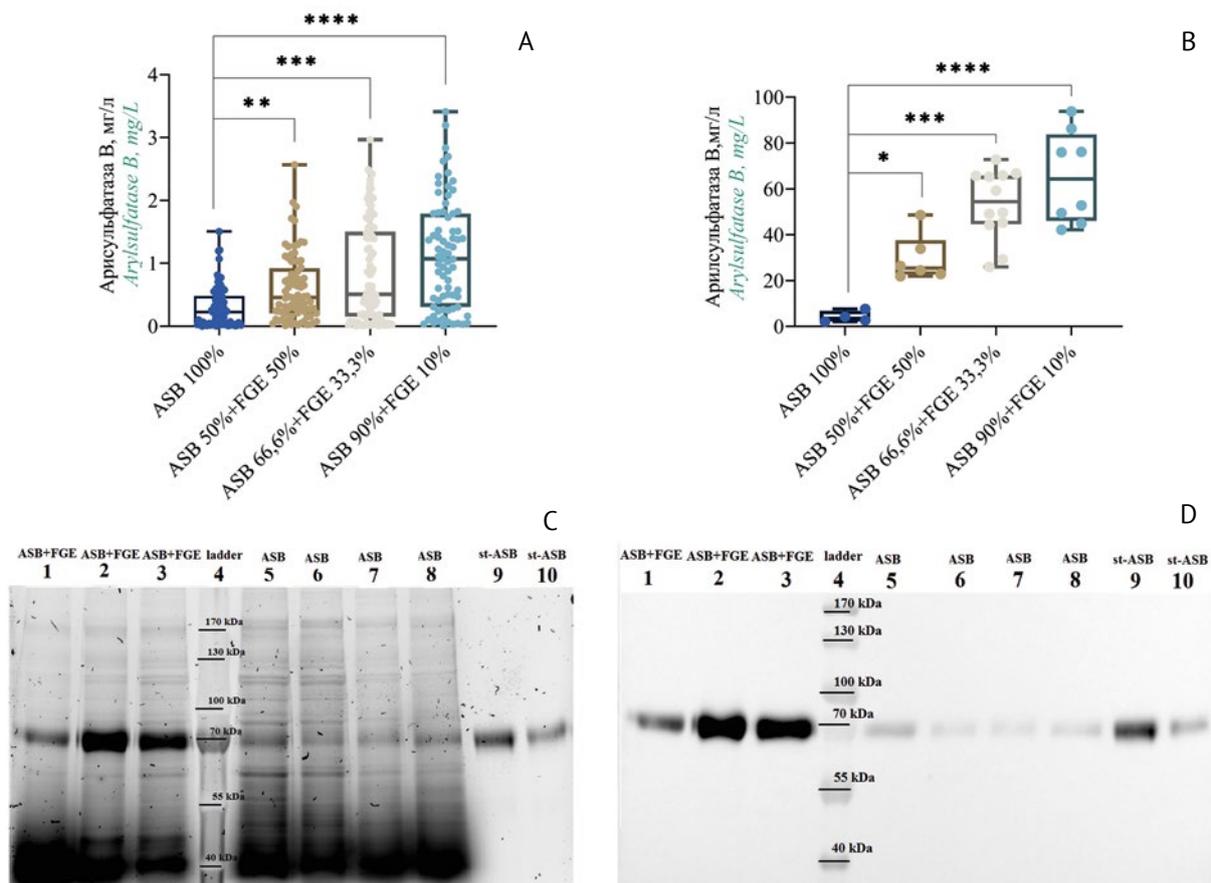


**Рис. 3.** Электрофореграмма и вестерн-блот анализ клон-продуцента ASB после котрансфекции плазмидой с геном, кодирующим вспомогательный белок FGE. А – электрофореграмма образцов культуральной жидкости (20 мкл/дорожка); В – вестерн-блот анализ образцов культуральной жидкости (антитела anti-ASB); С – электрофореграмма образцов лизатов ( $2 \times 10^5$  клеток/дорожка); Д – вестерн-блот анализ образцов лизатов (антитела anti-FGE). Обозначения на рисунке: ASB – клон-продуцент ASB; ASB+FGE – продуцент, коэкспрессирующий ферменты ASB и FGE; st-FGE – рекомбинантный FGE; st-ASB – рекомбинантный ASB (Наглазим); ladder – маркер молекулярной массы белков (10–180 kDa); количество повторностей образцов,  $n = 3$ .  $p_{\text{values}}$  рассчитывали с помощью теста one-way ANOVA, используя в качестве контроля группу ASB (\*  $p_{\text{values}} < 0,05$ , \*\*  $p_{\text{values}} < 0,01$ , \*\*\*  $p_{\text{values}} < 0,001$ , \*\*\*\*  $p_{\text{values}} < 0,0001$ ; ns – нет статистической разницы).

**Fig. 3.** Electropherogram and Western blot analysis of the ASB-producing clone after cotransfection with a plasmid carrying the gene encoding the auxiliary FGE protein. A – electropherogram of cell culture fluid samples (20  $\mu\text{L}$ /lane); B – Western blot analysis of cell culture fluid samples (anti-ASB antibodies); C – electropherogram of lysate samples ( $2 \times 10^5$  cells/lane); D – Western blot analysis of lysate samples (anti-FGE antibodies). Symbols used in the figure: ASB – ASB-producing clone; ASB+FGE – producer co-expressing ASB and FGE enzymes; st-FGE – recombinant FGE; st-ASB – recombinant ASB (Naglazyme); ladder – protein molecular weight marker (10–180 kDa); the number of replicate samples,  $n = 3$ .  $p_{\text{values}}$  were calculated by one-way ANOVA using the ASB group as control (\*  $p_{\text{values}} < 0.05$ , \*\*  $p_{\text{values}} < 0.01$ , \*\*\*  $p_{\text{values}} < 0.001$ , \*\*\*\*  $p_{\text{values}} < 0.0001$ , ns – no statistical difference).

**Таблица 2.** Соотношение плазмид при котрансфекции клеток линии CHO  
**Table 2.** Plasmid ratios used for cotransfection of CHO cells

Вариант трансфекции <i>Transfection options</i>	Плазмиды, кодирующие гены ферментов ASB и FGE (соотношение плазмид, %) <i>Plasmids encoding ASB and FGE enzyme genes (plasmid ratio)</i>
1	ASB (100)
2	ASB+FGE (50:50)
3	ASB+FGE (66,6:33,3)
4	ASB+FGE (90:10)



**Рис. 4.** Выход целевого белка минипулов-продуцентов ASB в зависимости от разного соотношения при трансфекции плазмид с генами, кодирующими ферменты ASB и FGE. А – продуктивность при скрининге образцов культуральной жидкости минипулов-продуцентов из 96-луночных планшетов (мг/л); В – продуктивность при скрининге образцов культуральной жидкости минипулов-продуцентов в условиях периодического культивирования в биореакторе в течение 6 дней (мг/л); С – электрофорез образцов культуральной жидкости; D – вестерн-блот анализ образцов культуральной жидкости (антитела anti-ASB). Обозначения на рисунке: ASB – минипулы-продуценты ASB; ASB+FGE – минипулы-продуценты, коэкспрессирующие ферменты ASB и FGE; st-ASB – рекомбинантный ASB (Наглазим); ladder – маркер молекулярной массы белков (10–180 кДа); количество повторностей образцов,  $n = 3$ . Данные  $p_{\text{value}}$  рассчитывали с помощью теста one-way ANOVA, используя в качестве контроля группу ASB 100% (\*  $p_{\text{values}} < 0,05$ , \*\*  $p_{\text{values}} < 0,01$ , \*\*\*  $p_{\text{values}} < 0,001$ , \*\*\*\*  $p_{\text{values}} < 0,0001$ ). Точками обозначены отдельные минипулы.

**Fig. 4.** The target protein yield of ASB-producing minipools depending on different ratios used for transfection of plasmids carrying genes encoding ASB and FGE enzymes. A—productivity according to screening of culture fluid samples of producer minipools from 96-well plates (mg/L); B—productivity according to screening of culture fluid samples of producer minipools following batch cultivation in a bioreactor for 6 days (mg/L); C—electropherogram of culture fluid samples; D—Western blot analysis of cell culture fluids samples (anti-ASB antibodies). Symbols used in the figure: ASB—ASB-producing minipools; ASB+FGE—producer minipools coexpressing ASB and FGE enzymes; st-ASB—recombinant ASB (Naglazyme); ladder—protein molecular weight marker (10–180 kDa); the number of replicate samples,  $n = 3$ .  $p_{\text{values}}$  were calculated by one-way ANOVA using the 100% ASB group as control (\*  $p_{\text{values}} < 0.05$ , \*\*  $p_{\text{values}} < 0.01$ , \*\*\*  $p_{\text{values}} < 0.001$ , \*\*\*\*  $p_{\text{values}} < 0.0001$ ). Individual minipools are marked with dots.

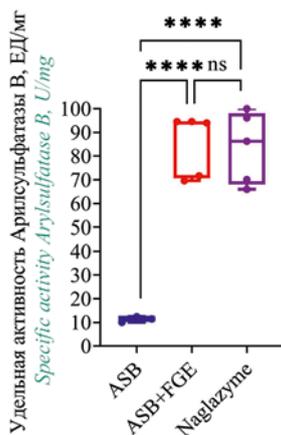
центра ASB, удалось увеличить выход целевого фермента ASB с 2,5 до 27 мг/л.

**Получение высокопродуктивной клеточной линии-продуцента арилсульфатазы В за счет подбора соотношения при трансфекции плазмид с генами, кодирующими целевой фермент арилсульфатазу В и вспомогательный формилглицин-генерирующий фермент**

Для получения высокопродуктивных клеточных линий проводили котрансфекцию роди-

тельской клеточной линии CHO при различных соотношениях плазмид с генами, кодирующими целевой фермент ASB и вспомогательный фермент FGE. В первом варианте (контроль) использовали одну плазмиду с целевым геном фермента ASB. В других вариантах котрансфекцию проводили с использованием разных соотношений двух плазмид, кодирующих гены ферментов ASB и FGE (табл. 2).

После селекции в среде с антибиотиком проводили последовательный скрининг по продук-



**Рис. 5.** Удельная активность фермента арилсульфатазы В, ЕД/мг. Обозначения на рисунке: ASB – минипулы-продуценты ASB; ASB+FGE – минипулы-продуценты, коэкспрессирующие ферменты ASB и FGE; Naglazyme – рекомбинантный фермент галсульфазы (Наглазим). Данные  $p$ value рассчитывали с помощью теста one-way ANOVA, используя в качестве контроля группу ASB 100% (\*\*\*\*  $p_{\text{values}} < 0,0001$ , ns – нет статистической разницы). Точками обозначены отдельные минипулы.

**Fig. 5.** Specific activity of the arylsulfatase B enzyme, U/mg. Symbols used in the figure: ASB—ASB-producing minipools; ASB+FGE—producer minipools coexpressing ASB and FGE enzymes; Naglazyme—recombinant galsulfase enzyme.  $p$ values were calculated by one-way ANOVA using the 100% ASB group as control (\*\*\*\*  $p_{\text{values}} < 0.0001$ , ns—no statistical difference). Individual minipools are marked with dots.

тивности минипулов из 96-луночных и 6-луночных планшетов. В итоге было отобрано 5–10 минипулов с наибольшей продуктивностью из каждого варианта трансфекции (табл. 2). Уже на стадии скрининга минипулов из 96-луночных планшетов было отмечено повышение продуктивности фермента ASB минипулов-продуцентов, коэкспрессирующих ASB+FGE, по сравнению с минипулами-продуцентами ASB (рис. 3А,  $p_{\text{values}} < 0,0001$ ).

Проводили периодическое культивирование минипулов-продуцентов, коэкспрессирующих ASB+FGE, и минипулов-продуцентов ASB в течение 6 суток для оценки роста и продуктивности. Минипулы-продуценты, экспрессирующие только ASB, имели продуктивность до 10 мг/л. Минипулы-продуценты, коэкспрессирующие ASB+FGE, имели продуктивность до 100 мг/л (рис. 3В).

Наиболее значительное увеличение выхода целевого фермента ASB наблюдали у минипулов, полученных при оптимальном соотношении плазмид, кодирующих ферменты ASB и FGE (%), равном 90:10 (табл. 2, рис. 4А, 4В).

Наблюдалось повышение продуктивности минипулов-продуцентов, коэкспрессирующих ASB+FGE (рис. 4С, 4D, дорожки 1–3), по сравнению с минипулами, экспрессирующими только ASB (рис. 4С, 4D, дорожки 5–8), что коррелирует с показанным в вестерн-блот анализе повышенным уровнем экспрессии ASB в клетках продуцентов, полученных при введении экзогенной копии гена FGE.

Молекулярная масса полученного рекомбинантного фермента ASB и его удельная активность (рис. 5) сопоставима с рекомбинантным белком

коммерчески доступного препарата Наглазим (BioMarin, США) (рис. 4С, 4D, дорожки 9–10).

## Выводы

1. В результате проведенных исследований на основе клеточной линии CHO получены высокопродуктивные клеточные линии-продуценты рекомбинантного фермента арилсульфатазы В, коэкспрессирующие целевой фермент арилсульфатазу В и вспомогательный формилглицин-генерирующий фермент.
2. Увеличение выхода активного целевого фермента арилсульфатазы В с 5 до 100 мг/л достигнуто за счет подбора при трансфекции оптимального соотношения плазмид, кодирующих целевой и вспомогательный ферменты. Наибольший выход арилсульфатазы В наблюдался при соотношении плазмид, кодирующих гены ферментов ASB и FGE, равном 90:10 (%).
3. Улучшение продукционных свойств клеточной линии при коэкспрессии арилсульфатазы В и формилглицин-генерирующего фермента обусловлено, по-видимому, модификацией активного центра целевого фермента арилсульфатазы В, катализируемой вспомогательным формилглицин-генерирующим ферментом, что обеспечивает правильный фолдинг, стабильную конфигурацию и функциональную активность арилсульфатазы В.
4. Полученные результаты позволяют решить проблему низкого выхода рекомбинантной лизосомальной сульфатазы, что является характерной проблемой при производстве препаратов данного класса.

5. Полученные клеточные линии-продуценты могут быть использованы в дальнейшей разработке лекарственного препарата на основе

рекомбинантной арилсульфатазы В для ферментозаместительной терапии мукополисахаридоза VI типа.

## Литература/References

1. Mikami T, Kitagawa H. Biosynthesis and degradation of glycans of the extracellular matrix: sulfated glycosaminoglycans, hyaluronan, and matriglycan. In: Barchi JJ, ed. *Comprehensive Glycoscience*. 2nd ed. Elsevier B.V.; 2021. P. 29–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819475-1.00018-3>
2. Matalon R, Matalon KM, Radhakrishnan GL. Chapter 35. The mucopolysaccharidoses. In: Rosenberg RN, Pascual JM, eds. *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease*. 5th ed. Elsevier Inc.; 2015. P. 347–63. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410529-4.00031-0>
3. Pastores GM. *Lysosomal Storage Disorders: Principles and Practice*. World Scientific; 2009. <https://doi.org/10.1142/7250>
4. Mehta A, Winchester B, eds. *Lysosomal Storage Disorders: A Practical Guide*. John Wiley & Sons, Ltd.; 2012. <https://doi.org/10.1002/9781118514672>
5. Remondino RG, Tello CA, Noel M, Wilson AF, Galarretto E, Bersusky E, Piantoni L. Clinical manifestations and surgical management of spinal lesions in patients with mucopolysaccharidosis: a report of 52 cases. *Spine Deform*. 2019;7(2):298–303. <https://doi.org/10.1016/j.jspd.2018.07.005>
6. Vollebregt AAM, Hoogeveen-Westerveld M, Kroos MA, Oussoren E, Plug I, Ruijter GJ, et al. Genotype–phenotype relationship in mucopolysaccharidosis II: predictive power of IDS variants for the neuronopathic phenotype. *Dev Med Child Neurol*. 2017;59(10):1063–70. <https://doi.org/10.1111/dmcn.13467>
7. Burrow TA, Leslie ND. Review of the use of idursulfase in the treatment of mucopolysaccharidosis II. *Biologics*. 2008;2(2):311–20.
8. Harmatza P, Hendriks CJ, Lampe C, McGill JJ, Parini R, Leão-Teles E, et al. The effect of galsulfase enzyme replacement therapy on the growth of patients with mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *Mol Genet Metab*. 2017;122(1-2):107–12. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.03.008>
9. Harmatz P, Giugliani R, D Schwartz IV, Guffon N, Teles EL, Miranda MCS, et al. MPS VI Study Group. Long-term follow-up of endurance and safety outcomes during enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: Final results of three clinical studies of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *Mol Genet Metab*. 2008;94(4):469–75. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2008.04.001>
10. Wiegmann EM, Westendorf E, Kalus I, Pringle TH, Lübke T, Dierks T. Arylsulfatase K, a novel lysosomal sulfatase. *J Biol Chem*. 2013;288(42):30019–28. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.499541>
11. Ghosh D. Three-dimensional structures of sulfatases. *Methods Enzymol*. 2005;400:273–93. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)00016-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)00016-9)
12. Ruijter J, de Ru MH, Wagemans T, Ijlst L, Lund AM, Orchard PJ, et al. Heparan sulfate and dermatan sulfate derived disaccharides are sensitive markers for newborn screening for mucopolysaccharidoses types I, II and III. *Mol Genet Metab*. 2012;107(4):705–10. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.09.024>
13. Reed MJ, Purohit A, Woo LWL, Newman SP, Potter BVL. Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition. *Endocr Rev*. 2005;26(2):171–202. <https://doi.org/10.1210/er.2004-0003>
14. Peng J, Alam S, Radhakrishnan K, Mariappan M, Rudolph MG, May C, et al. Eukaryotic formylglycine-generating enzyme catalyses a monooxygenase type of reaction. *FEBS J*. 2015;282(17):3262–74. <https://doi.org/10.1111/febs.13347>
15. Appel MJ, Bertozzi CR. Formylglycine, a post-translationally generated residue with unique catalytic capabilities and biotechnology applications. *ACS Chem Biol*. 2015;10(1):72–84. <https://doi.org/10.1021/cb500897w>
16. Dierks T, Miech C, Hummerjohann J, Schmidt B, Kertesz MA, von Figura K. Posttranslational formation of formylglycine in prokaryotic sulfatases by modification of either cysteine or serine. *J Biol Chem*. 1998;273(40):25560–4. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.25560>
17. Dierksa T, Schlotawa L, Frese M-A, Radhakrishnan K, von Figura K, Schmidt B. Molecular basis of multiple sulfatase deficiency, mucopolipidosis II/III and Niemann–Pick C1 disease – lysosomal storage disorders caused by defects of non-lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793(4):710–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.11.015>
18. Diez-Roux G, Ballabio A. Sulfatases and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2005;6:355–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.6.080604.162334>
19. Demydchuk M, Hill CH, Zhou A, Bunkóczi G, Stein PE, Marchesanet D, et al. Insights into Hunter syndrome from the structure of iduronate-2-sulfatase. *Nat Commun*. 2017;8:15786. <https://doi.org/10.1038/ncomms15786>
20. Ulmer JE, Vilén EM, Namburi RB, Benjdia A, Benteau J, Malleron A, et al. Characterization of glycosaminoglycan (GAG) sulfatases from the human gut symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron* reveals the first GAG-specific bacterial endosulfatase. *J Biol Chem*. 2014;289(35):24289–303. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.573303>
21. Dierks T, Dickmanns A, Preusser-Kunze A, Schmidt B, Mariappan M, Figura K, et al. Molecular basis for multiple sulfatase deficiency and mechanism for formylglycine generation of the human formylglycine-generating enzyme. *Cell*. 2005;121(4):541–52. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.03.001>

22. Dickmanns A, Schmidt B, Rudolph MG, Mariappan M, Dierks T, Figura K, Ficner R. Crystal structure of human pFGE, the paralog of the Calpha-formylglycine-generating enzyme. *J Biol Chem*. 2005;280(15):15180–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414317200>
23. Mariappan M, Preusser-Kunze A, Balleininger M, Eisele N, Schmidt B, Gande SL, et al. Expression, localization, structural, and functional characterization of pFGE, the paralog of the C $\alpha$ -formylglycine-generating enzyme. *J Biol Chem*. 2005;280(15):15173–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413698200>
24. Sardiello M, Annunziata I, Roma G, Ballabio A. Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship. *Hum Mol Genet*. 2005;14(21):3203–17. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi351>
25. Peng J, Alam S, Radhakrishnan K, Mariappan M, Rudolph MG, May C, et al. Eukaryotic formylglycine-generating enzyme catalyses a monooxygenase type of reaction. *FEBS J*. 2015;282(17):3262–74. <https://doi.org/10.1111/febs.13347>
26. Тимонова СС, Павелко ВИ, Кирик ИА, Бадэ ВН, Малыгина ТО, Хамитов РА, Пискунов АА. Принцип оперативного выбора лидерных клонов-продуцентов моноклональных антител при создании стабильных клеточных линий на основе CHO. *Биотехнология*. 2019;35(4):65–72. [Timonova SS, Pavelko VI, Kirik IA, Bade VN, Malygina TO, Khamitov RA, Piskunov AA. Principle of express selection of leading producing clones of monoclonal antibodies in the development of stable CHO-based cell lines. *Biotechnologiya = Biotechnology*. 2019;35(4):65–72 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-4-65-72>
27. Muralidharan-Chari V, Wurz Z, Doyle F, Henry M, Diendorfer A, Tenenbaum SA, et al. PTSelect™: a post-transcriptional technology that enables rapid establishment of stable CHO cell lines and surveillance of clonal variation. *J Biotechnol*. 2021;325:360–71. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.09.025>
28. Steger K, Brady J, Wang W, Duskin M, Donato K, Peshwa M. CHO-S antibody titers >1 gram/liter using flow electroporation-mediated transient gene expression followed by rapid migration to high-yield stable cell lines. *J Biomol Screen*. 2015;20(4):545–51. <https://doi.org/10.1177/1087057114563494>
29. Brown AJ, Gibson S, Hatton D, James DC. Transcriptome-based identification of the optimal reference CHO genes for normalisation of qPCR data. *Biotechnol J*. 2018;13(1). <https://doi.org/10.1002/biot.201700259>
30. Chopra A, Willmore WG, Biggar KK. Protein quantification and visualization via ultraviolet-dependent labeling with 2,2,2-trichloroethanol. *Sci Rep*. 2019;9(1):13923. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50385-9>

**Вклад авторов.** С.С. Тимонова – идея экспериментов, получение клеточных линий-продуцентов арилсульфатазы В, проведение исследования, анализ данных, написание текста статьи; К.А. Смолова – разработка методики очистки и выделения фермента; Д.Т. Зарипова – измерение мРНК; М.С. Пантюшенко – разработка метода измерения активности фермента; М.А. Королева – измерение активности фермента; Р.Л. Анисимов – дизайн генов ARBS и SUMF1, планирование и анализ работ по молекулярной биологии; Р.А. Хамитов – определение основного направления исследования, утверждение окончательной версии статьи; А.А. Пискунов – идея и планирование исследования, анализ данных; В.Н. Бадэ – идея и планирование исследования, анализ данных.

**Благодарности.** Данное исследование выполнено в рамках разработки биотехнологического препарата против мукополисахаридоза VI типа в АО «ГЕНЕРИУМ». Авторы выражают признательность коллегам, которые оказывали помощь в выполнении исследования, сотрудникам отдела молекулярной и клеточной биологии. Авторы также выражают особую благодарность менеджеру проекта, начальнику отдела молекулярной диагностики Н.А. Литвиновой.

**Конфликт интересов.** Р.А. Хамитов является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

**Authors' contributions.** S.S. Timonova—elaborated and planned the experiments, developed arylsulfatase B-producing cell lines, performed data analysis, wrote the manuscript; K.A. Smolova—developed the method for enzyme purification and isolation; D.T. Zaripova—performed measurement of mRNA; M.S. Pantyushenko—developed the method for enzymatic activity measurement; M.A. Koroleva—performed enzyme activity measurement; R.L. Anisimov—designed ARSB and SUMF1 genes, planned molecular biology experiments and analysed their results; R.A. Khamitov—supervised the project, approved the final version of the paper; A.A. Piskunov—contributed to the design and planning of the research, performed data analysis; V.N. Bade—contributed to the design and planning of the research, performed data analysis.

**Acknowledgements.** This study was carried out as part of the project for the development of a biotechnological product against mucopolysaccharidosis type VI at JSC “GENERIUM”. The authors are grateful to their colleagues from the Department of Molecular and Cellular Biology who helped them with this study. The authors also express special thanks to N.A. Litvinova, Head of the project, Head of the Molecular Diagnostics Department.

**Conflict of interest.** R.A. Khamitov is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

## Об авторах / Authors

**Тимонова Софья Сергеевна**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2733-7458>  
[timonova1993@yandex.ru](mailto:timonova1993@yandex.ru)

**Смолова Ксения Александровна**, канд. хим. наук.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9135-9673>  
[Smolova@ibcgenerium.ru](mailto:Smolova@ibcgenerium.ru)

**Зарипова Доля Тагировна**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6104-3352>  
[Zaripova@ibcgenerium.ru](mailto:Zaripova@ibcgenerium.ru)

**Пантюшенко Марина Семеновна**, канд. биол. наук.  
[Pantyushenko@ibcgenerium.ru](mailto:Pantyushenko@ibcgenerium.ru)

**Королева Мария Александровна**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5721-0557>  
[Kakoroleva@ibcgenerium.ru](mailto:Kakoroleva@ibcgenerium.ru)

**Анисимов Роман Львович**, канд. биол. наук.  
[Anisimov@ibcgenerium.ru](mailto:Anisimov@ibcgenerium.ru)

**Хамитов Равиль Авгатович**, д-р мед. наук, проф.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>  
[Khamitov@ibcgenerium.ru](mailto:Khamitov@ibcgenerium.ru)

**Пискунов Александр Александрович**, канд. биол. наук.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5552-5419>  
[Piskunov@ibcgenerium.ru](mailto:Piskunov@ibcgenerium.ru)

**Бадэ Вероника Николаевна**, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9877-5220>  
[Bade@ibcgenerium.ru](mailto:Bade@ibcgenerium.ru)

*Поступила 24.08.2021*

*После доработки 01.03.2022*

*Принята к публикации 11.03.2022*

**Sofia S. Timonova**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2733-7458>  
[timonova1993@yandex.ru](mailto:timonova1993@yandex.ru)

**Kseniya A. Smolova**, Cand. Sci. (Chem.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9135-9673>  
[Smolova@ibcgenerium.ru](mailto:Smolova@ibcgenerium.ru)

**Doliya T. Zaripova**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6104-3352>  
[Zaripova@ibcgenerium.ru](mailto:Zaripova@ibcgenerium.ru)

**Marina S. Pantyushenko**, Cand. Sci. (Biol.).  
[Pantyushenko@ibcgenerium.ru](mailto:Pantyushenko@ibcgenerium.ru)

**Mariya A. Koroleva**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5721-0557>  
[Kakoroleva@ibcgenerium.ru](mailto:Kakoroleva@ibcgenerium.ru)

**Roman L. Anisimov**, Cand. Sci. (Biol.).  
[Anisimov@ibcgenerium.ru](mailto:Anisimov@ibcgenerium.ru)

**Ravil A. Khamitov**, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>  
[Khamitov@ibcgenerium.ru](mailto:Khamitov@ibcgenerium.ru)

**Aleksandr A. Piskunov**, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5552-5419>  
[Piskunov@ibcgenerium.ru](mailto:Piskunov@ibcgenerium.ru)

**Veronika N. Bade**, Cand. Sci. (Biol.) ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9877-5220>  
[Bade@ibcgenerium.ru](mailto:Bade@ibcgenerium.ru)

*Received 24 August 2021*

*Revised 1 March 2022*

*Accepted 11 March 2022*