

СИСТЕМНЫЙ АНАЛИЗ, МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ,  
ИНФОРМАЦИОННЫЕ СИСТЕМЫ

УДК 57.087.1

МЕТОД МОНТЕ-КАРЛО ДЛЯ ВЫЧИСЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ  
МОНОКЛОНАЛЬНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

© 2024 г. С. С. Тимонова<sup>1</sup>, \*, В. И. Павелко<sup>1</sup>, И. А. Кирик<sup>1</sup>,  
В. Н. Бадэ<sup>1</sup>, А. А. Пискунов<sup>1</sup>, Р. А. Хамитов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>АО «ГЕНЕРИУМ», пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125 Россия

\*e-mail: timonova1993@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.11.2023 г.

После доработки 15.12.2023 г.

Принята к публикации 18.12.2023 г.

В работе описано получение моноклональных клеточных линий-продуцентов с помощью роботизированной системы ClonePix™ FL. Исследование проведено на клетках яичника китайского хомячка (СНО), продуцирующих фермент арилсульфатазу В (ASB). Получено 20 лидерных клонов — продуцентов рекомбинантного лизосомального фермента ASB. Вероятность моноклональности, вычисленная по формуле, предложенной разработчиками системы ClonePix™ FL, составила 99.94%. Вероятность моноклональности, рассчитанная по методу Монте-Карло, составила 97.79%. Метод Монте-Карло дает более точную оценку вероятности моноклональности, что позволяет скорректировать процесс получения клонов и оптимизировать посев клеток в полутвердой среде за счет учета дополнительных параметров. Значение вероятности моноклональности клонов-продуцентов — необходимый параметр при регистрации препарата.

**Ключевые слова:** линии клеток млекопитающих, клетки яичника китайского хомяка, моноклональность, ClonePix™ FL, метод Монте-Карло, вероятность моноклональности, арилсульфатаза В, галсульфаза

DOI: 10.56304/S0234275824010113

Для создания высокотехнологичных биофармацевтических препаратов на основе клеток млекопитающих необходимо получение клеточных линий-продуцентов, обладающих способностью стабильно экспрессировать целевой продукт [1]. Международные требования производства биофармацевтических препаратов (Q5D Quality of Biotechnological/Biological Products FDA; <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q5d-quality-biotechnological-biological-products-derivation-and-characterization-cell-substrates-used>) рекомендуют использовать моноклональные клеточные линии (потомки одной клетки), стабильно продуцирующие рекомбинантные терапевтические белки для коммерческого производства. Моноклональность клонов-продуцентов обеспечивает стабильные ростовые характеристики в течение длительного времени и воспроизводимое качество экспрессируемых белков [1], что благоприятно влияет на долгосроч-

ные промышленные процессы культивирования [3] и последующий терапевтический эффект лекарственного средства [2]. Таким образом, клонирование — один из ключевых этапов в разработке клеточных линий-продуцентов рекомбинантных терапевтических белков.

Подтверждение моноклональности клеточных линий-продуцентов имеет решающее значение в фармацевтической разработке. В настоящий момент используют различные методики и оборудование для их получения, которые основаны на различных подходах.

Клонирование методом предельного разведения относится к наиболее часто используемым технологиям получения моноклональных клеточных линий-продуцентов. Суть метода заключается в разведении клеточной суспензии до крайне низкой плотности — менее одной клетки в лунке, — после чего проводят рассев полученной суспензии в планшеты. Метод основан на распределении Пуассона, что позволяет получить моноклоны с вероятностью более 99% [5].

К недостаткам метода можно отнести малую выборку получаемых клонов-продуцентов, трудоемкость процесса отбора моноклонов и человеческий фактор. Более того, нет гарантии, что ото-

*Список сокращений:* ASB (arylsulfatase B) — арилсульфатаза В; CCD (cumulative cell density) — кумулятивная плотность клеток; СНО (Chinese hamster ovary) — клетки яичника китайского хомячка; FGE (formylglycine-generating enzyme) — формилглицингенерирующий фермент; VCD (viable cell density) — плотность жизнеспособных клеток; КЖ — культуральная жидкость.

бренные колонии происходят из отдельных клеток, так как с помощью светового микроскопа идентифицировать моноклон трудно, поэтому рекомендуется проводить дополнительное, повторное клонирование полученных линий.

На сегодняшний день разработаны автоматизированные системы фоторегистрации высокого разрешения, которые используют для подтверждения происхождения клона из одной клетки по задокументированным снимкам процесса роста колонии. К таким приборам относятся Cell Metric® CLD (Solentim, Великобритания). Также используют приборы автоматического внесения единичных клеток в лунки с последующей фоторегистрацией, что гарантирует моноклональность происходящей линии: например, Solentim Verified In situ Plate Seed (VIPS™; Advanced Instruments, Великобритания).

Еще один широко используемый метод – *сортировка клеток*. С помощью клеточного сортера, сочетающего в себе проточный цитометр и сортировщик клеток, можно выделять различные субпопуляции и отбирать единичные клетки с заданными характеристиками (по экспрессии целевого маркера) из смешанных клеточных популяций [6]. Проточный цитометр различает клетки по нескольким параметрам: размер (по светорассеянию) и экспрессия целевых белков (детекция флуоресцентно меченных специфических антител), – что позволяет сортировать различные типы клеток. В настоящее время уже используют приборы, позволяющие проводить отбор и получение моноклонов на основе проточной цитометрии и клеточного сортирования [7].

*Клонирование с помощью полутвердых питательных сред*. В производстве биофармацевтических продуктов очень часто используют генетические конструкции, которые позволяют экспрессировать целевые рекомбинантные белки в культуральную жидкость (КЖ). С точки зрения технологического процесса, культивирование таких продуцентов является более приоритетным, так как дальнейший этап очистки таких белков проще и дешевле.

Для клеток, экспрессирующих целевые белки в КЖ, необходим метод, в котором целевой белок “удерживается” вблизи секретирующей его клетки. Для этого используют протоколы клонирования на основе различных матриц: нитроцеллюлозы, агарозы, метилцеллюлозы, матригеля и других сред в качестве гелевой основы. Достаточно большие (>0.5 мм) колонии можно отбирать вручную с помощью микропипетки, что позволяет использовать этот метод практически в любой лаборатории.

На данный момент известно несколько автоматических систем для отбора моноклональных клеточных линий-продуцентов на основе роста в полутвердой среде: ClonePix (Molecular Devices, США) и CellSelector Flex (Sartorius Stedim Biotech

Group, Германия). Каждый метод и/или прибор имеет как недостатки, так и неоспоримые преимущества.

Иногда особенности морфологии клеточной линии или характеристики целевого продукта не позволяют использовать тот или иной способ получения моноклонов, поэтому в каждом случае выбирают оптимальный метод клонирования или комбинируют различные подходы.

Широко распространены в биофармацевтической промышленности клетки яичника китайского хомячка (СНО), адаптированные к суспензионному культивированию без использования компонентов животного происхождения. Линия клеток СНО подходит для крупномасштабных промышленных суспензионных процессов культивирования, так как позволяет получать высокие значения плотности клеток и выхода целевого белка [8, 9]. Кроме того, паттерн гликозилирования белков, полученных в клетках СНО, близок к тому, который характерен для клеток человека, что важно для биологической активности и снижения иммуногенности целевого продукта в организме человека [10]. Еще один важный фактор – пониженная восприимчивость клеток СНО ко многим вирусам человека, что обеспечивает им преимущества в рамках коммерческого производства и биобезопасности [11].

Нарушение работы гена *ARSB*, кодирующего лизосомальный фермент арилсульфатазу В (ASB; ЕС 3.1.6.12), приводит к генетическому орфанному заболеванию – мукополисахаридозу VI типа (МПС VI). Дефицит ASB в организме способствует накоплению гликозаминогликанов (GAG) в лизосомах, что в свою очередь нарушает обмен веществ во всем организме. ASB расщепляет GAG, удаляя сульфатные группы из субстрата хондроитин-4-сульфата (C4S) [12]. На данный момент единственный одобренный препарат для лечения МПС VI – фермент галсульфаза (рекомбинантный аналог ASB) под торговой маркой Naglazyme® (BioMarin International Limited, Ирландия). Препарат используют для лечения взрослых и детей с МПС VI [13–15]: раннее диагностирование заболевания и своевременная ферментзаместительная терапия позволяет существенно замедлить и снизить проявление клинических симптомов [16]. Экспрессия фермента ASB сопряжена с определенными трудностями: во время биосинтеза, сразу после трансляции полипептидной цепи, требуется посттрансляционная модификация активного центра ASB под действием формилглицингенерирующего фермента (formylglycine-generating enzyme, FGE; ЕС 1.8.3.7) [17–19]. Ранее нами получены клеточные линии, коэкспрессирующие FGE и целевой продукт ASB с высокой удельной активностью [8].

Цель проведенного исследования заключалась в получении моноклональных клеточных линий –

продуцентов терапевтического рекомбинантного белка ASB – и разработке метода вычисления вероятности моноклональности клеточных линий на основе метода Монте-Карло.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### *Клетки линии СНО*

Клетки линии СНО-К1 (НИЦ “Курчатовский институт” – ГосНИИгенетика, Россия) были адаптированы к суспензионному культивированию в среде, не содержащей сыворотку или другие компоненты животного происхождения (далее: СНО). Клетки культивировали в среде BalanCD Growth A (BCD; FujiFilm, Япония) при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и влажности >75% в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Sanyo, Япония).

### *Расчет ростовых характеристик*

Плотность жизнеспособных клеток (viable cell density, VCD) и жизнеспособность культуры определяли с помощью автоматического счетчика клеток Countess II FL (Thermo Fisher Scientific, США). Кумулятивную клеточную плотность (cumulative cell density, CCD) рассчитывали по ранее описанному алгоритму [20].

### *Получение клонов-продуцентов*

За сутки до предстоящего клонирования минипулы-продуценты ASB + FGE рассеивали в среде BCD для достижения логарифмической фазы роста клеток. На следующие сутки проводили рассев минипулов-продуцентов в полутвердую среду ClonaCell Flex (Stemcell Technologies, Канада) в концентрации 10 клеток/мл. Для приготовления полутвердой среды для клонирования использовали 4× BCD и 48-часовую кондиционированную среду исходного минипула клеток. Планшеты с растущими колониями клонов инкубировали 10 сут при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 70%-ной влажности в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Отбор клонов проводили с помощью роботизированной системы Clone Pix FL (Molecular Devices). Колонии исключали по следующим параметрам: близкое расположение к краю лунки, размер колонии ≥0.35 мм<sup>2</sup> или ≤0.05 мм<sup>2</sup>, компактность колонии ≤0.8, отношение длины колонии к ее ширине ≤0.8, расстояние до соседней колонии ≤1.

### *Иммуноферментный анализ (ИФА)*

Для определения концентрации целевого фермента в КЖ (продуктивность, мг/л) проводили непрямой неконкурентный ИФА в 96-луночных планшетах Medisorb Microplates (Nunc, Дания). В качестве сортирующих антител использовали поликлональные крысиные антителами к ASB, а для

детекции целевого белка – те же антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (АО “Генериум”, Россия). В качестве стандарта использовали препарат Naglazyme® (BioMarin International Limited, США). Результаты регистрировали на приборе Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, США) при длине волны 450 нм. Проводили серию последовательных скринингов КЖ клонов из 96-, 24- и 6-луночных планшетов для выбора наиболее продуктивных по целевому продукту.

### *Культивирование клонов-продуцентов*

Непрерывное культивирование проводили в TubeSpin Bioreactor 50 (TPP Techno Plastic Products AG, Швейцария). Клетки засеивали в 25 мл среды BCD с начальной плотностью 0.3 × 10<sup>6</sup> клеток/мл и культивировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 200 об/мин в шейкер-инкубаторе Climo-Shaker ISF1-XC Kuhner (Kuhner, Германия).

### *Вычисление вероятности моноклональности*

Вероятность моноклональности можно вычислять по формуле (1), опубликованной производителем прибора ClonePix FL (<https://www.geneng-news.com/magazine/122/using-clonepix-fl-to-assess-monoclonality>):

$$p = 1 - \frac{0.25\pi(2r + 2r)^2 (n - 1)}{0.25\pi D^2}, \quad (1)$$

где  $p$  – вероятность моноклональности,  $n$  – число выросших колоний,  $D$  – диаметр культуральной лунки,  $r$  – средний радиус выросшей колонии. Однако при использовании этой формулы мы обнаружили ее ограничения, так как для клеточных колоний большего радиуса рассчитанные значения вероятности моноклональности принимали отрицательные значения.

Нами предложен и использован другой метод вычисления вероятности – на основе метода Монте-Карло. Для построения алгоритма использовали скрипт, написанный с помощью языка программирования R для статистической обработки данных. Параметры всех объектов экспортировали из отчета ClonePix. Для получения формулы распределения клеточных колоний по радиусу использовали выборку из колоний, которые были отмечены к отбору при работе на ClonePix FL. На основе этой выборки, в которую вошло 774 значения радиусов ( $r$ ) клеточных колоний, получили формулу, по которой эти значения распределяются с помощью пакета fitdistrplus R (<https://cran.r-project.org/web/packages/fitdistrplus/index.html>). Затем генерировали 34 колонии с диаметрами, взятыми из этого распределения. Эти колонии случайно располагали на квадрате площадью 109 мм<sup>2</sup>, равной площади культураль-

ной лунки диаметром 34.8 мм. Колонии считали пересекающимися, если их центры располагались на расстоянии, меньшем суммы их радиусов, то есть при выполнении условия:

$$(x - x')^2 + (y - y')^2 \leq (r + r')^2, \quad (2)$$

где  $(x, y)$  и  $(x', y')$  – координаты центров двух колоний,  $r$  и  $r'$  – соответственно радиусы этих колоний.

Каждую из колоний проверяли на соответствие этому условию в сравнении с расположением остальных 33 колоний. Вероятность моноклональности клеточной линии рассчитывали по формуле (3):

$$p = 1 - \frac{N}{n}, \quad (3)$$

где  $n$  – число выросших колоний,  $N$  – число пересекающихся колоний,  $p$  – вероятность моноклональности линии.

Такую симуляцию лунки с 34 колониями на ней проводили  $10^4$  раз и находили среднюю вероятность пересечения. Вычисления находятся в свободном доступе в GitHub (<https://github.com/vasily-pavelko/calculating-probability-of-circle-overlapping-by-Monte-Carlo-simulation/>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Отбор клонов на роботизированной системе ClonePix*

Отбор клонов проводили с помощью роботизированной системы ClonePix FL (Molecular Devices). Система проводит фотодокументирование планшетов с колониями клонов, программное обеспечение позволяет автоматически учитывать такие особенности выросших колоний, как размер, форма и расстояние между ними. На рис. 1а представлена фотография, сделанная с помощью камеры-робота ClonePix в момент захвата колонии клон: до и сразу после отбора колонии пинном; на рис. 1б – фотография полутвердой среды с колониями во время работы робота в момент сортировки, на рис. 1с – колония в полутвердой среде до момента отбора роботом (потенциальный клон-продуцент).

Колонии были отсортированы и исключены по 6 параметрам (рис. 1d):

- параметр Edge excluded исключает колонии близко расположенные к краю лунки;

- параметр Too big большой размер колоний исключает нежелательные объекты (например, пузыри) и слишком большие колонии. Вероятнее всего, такая колония получена в результате деления более чем одной клетки. Кроме того, в колонии, состоящей более чем из 500 клеток, расположенные в середине колонии клетки могут стать нежизнеспособными из-за нехватки питательных веществ и отсутствия процессов газообмена;

- параметр Too small определяет маленькие по площади колонии, что может свидетельствовать о медленном росте и/или присутствии нежелательных объектов (например, мелкие осколки полутвердой среды, мелкие пузырьки воздуха). Оптимальный размер колоний для отбора – около 32–256 клеток (5–9 генераций). Отбор очень маленьких или очень больших колоний нежелателен из-за возможных проблем с ростом, жизнеспособностью и адаптацией к суспензионному культивированию;

- параметр Irregular 1 отражает компактность колонии: идеально круглая колония имеет значение 1, а колония с периметром вдвое больше – 0.5 и т.д.;

- параметр Irregular 2 – отношение длины колонии к ее ширине. Значение параметра Irregular 1 или Irregular 2 должно быть не менее 0.6, так как именно в этом случае отобранные колонии можно считать происходящими из одной клетки, то есть моноклональной популяцией;

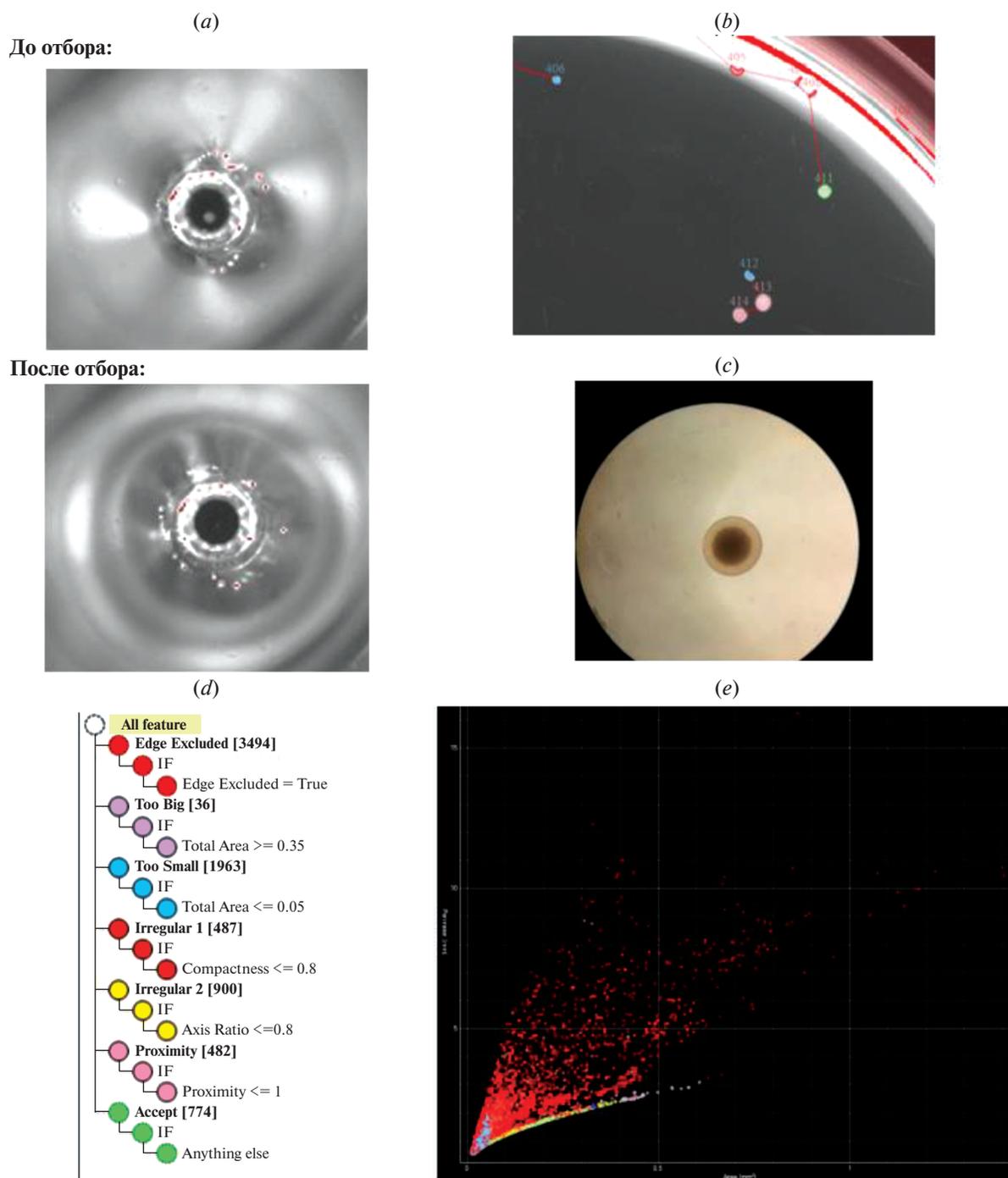
- еще один важный параметр сортировки клонов – Proximity, который характеризует расстояние между колониями, то есть близость выбранной колонии к соседней.

В фильтре Ассерпт указано число колоний, пригодных для отбора (рис. 1d, квадратные скобки). Все обнаруженные колонии отображаются на графике распределения колоний в зависимости от их периметра и площади, где зеленым отмечены колонии, пригодные для отбора (рис. 1e).

Проведена фоторегистрация 16 6-луночных планшетов. Всего на планшетах было зарегистрировано более 8136 объектов, в которых попадали микропузырьки воздуха, неровности поверхности пластика и полутвердой среды, микроцарапины на дне, края лунки и сами колонии. С помощью фильтров ClonePix было отобрано 774 колонии, то есть в среднем 8 колоний с лунки. Учитывая, что для отбора выбирали только колонии, удовлетворяющие определенным условиям, мы провели визуальный подсчет выросших колоний с помощью микроскопа и обнаружили в среднем 34 колонии на лунку.

### *Расчет вероятности моноклональности клеточной линии*

Моноклональность клон-продуцента, вычисленная по формуле (1) при среднем радиусе колоний 0.2252 мм, диаметре лунке 35 мм и выросшем числе колоний 34, составила 99.94%. Однако в этой формуле не учитывается распределение колоний по диаметру, а используется среднее арифметическое. Мы разработали метод симуляции, который учитывает распределение колоний по радиусу, что позволяет дать более точную оценку вероятности моноклональности.

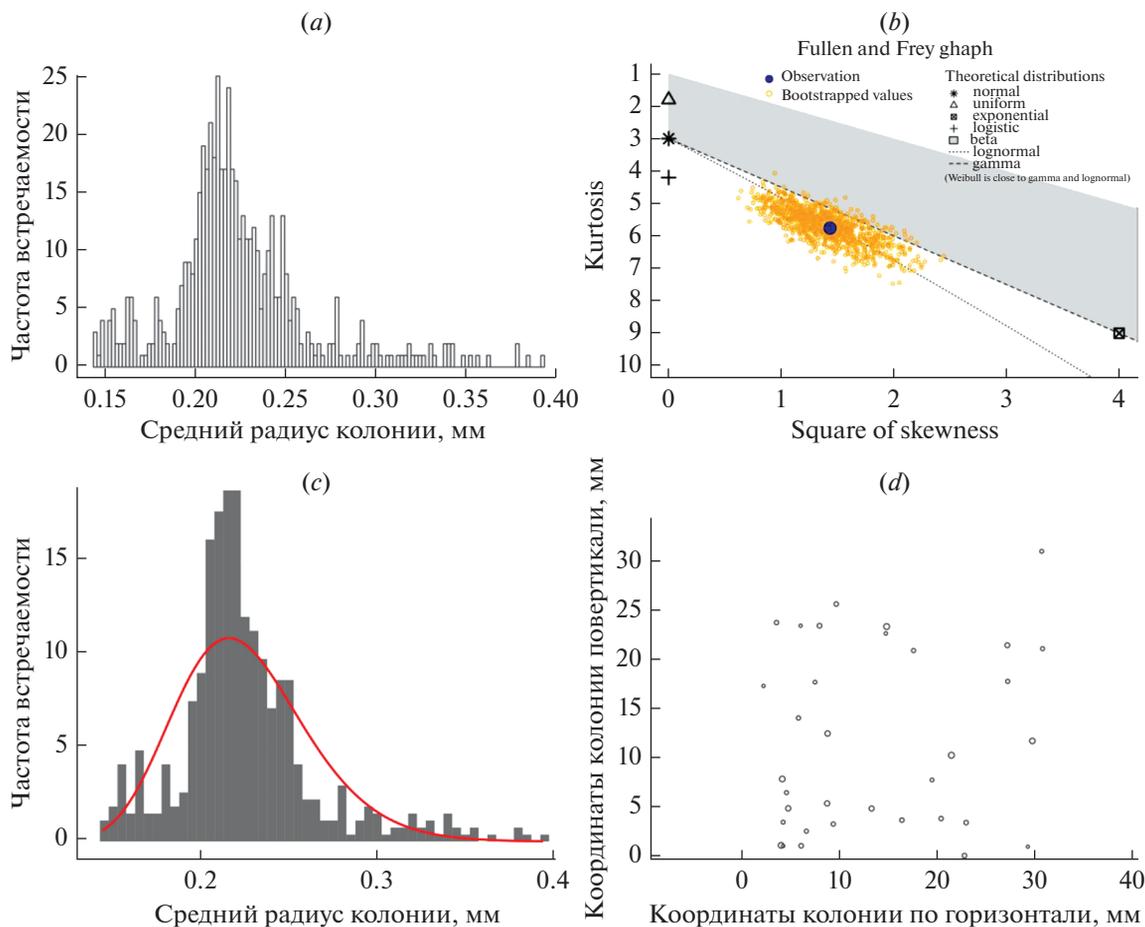


**Рис. 1.** Отбор клонов с использованием роботизированной системы ClonePix. Фотография колонии клеток до и после отбора (a); рост колоний клеток в полутвердой среде до отбора (b); одиночная колония клеток в полутвердой среде,  $\times 10$  (c); распределение всех колоний по заданным параметрам сортировки (d), по площади и периметру (e). Подробное объяснение видов (d) и (e) см. в тексте.

**Fig. 1.** Selection of clones using the ClonePix robotic system. Photograph of a cell colony before and after picking (a); growth of cell colonies on a semi-solid medium before picking (b); single colony on a semi-solid medium,  $\times 10$  (c); distribution of all colonies according to specified sorting parameters (d), area and perimeter (e). For a detailed explanation of fig. 1(d, e), see the text.

Для моделирования использовали только колонии, которые отобрали в 96-луночные планшеты (группа Accepted). Распределение радиусов этих колонии представлено на рис. 2a, их значения унимо-

дальны. С помощью пакета fitdistrplus было подобрано наиболее близкое распределение – логнормальное (рис. 2b) с параметрами  $\text{meanlog} = -1.5052555$  и  $\text{sdlog} = 0.1677568$ . Подобранное логнормальное рас-



**Рис. 2.** Вычисление вероятности моноκлональности клеточных линий. (a) – Гистограмма значений радиусов выросших колоний; (b) – выбор распределения по графику Кулена и Фрея; (c) – сравнение подобранного распределения и реальных значений радиусов колоний; (d) – пример лунки с симулированными колониями.

**Fig. 2.** Calculation of the probability of monoκlonality of cell lines. (a)—Histogram of radius values of grown colonies; (b)—selection of distribution according to the Coolen and Frey plot; (c)—comparison of the selected distribution and real values of colony radii; (d)—example of a well with simulated colonies.

пределение соответствует экспериментальному (рис. 2c). Вычисленные параметры позволили генерировать бесконечное число объектов из этого распределения. Затем провели симуляцию с генерированием 34 колоний в лунке (рис. 2d). Как видно из рис. 2d, примерно одна колония из 34 на планшете пересекается. После проведения симуляции  $10^4$  раз средняя вероятность моноκлональности составила 97.79%. С целью сравнить границы применимости формулы ClonePix мы составили табл. 1 и 2 для различных вариантов посевной плотности и размера колоний.

Вероятность расчета моноκлональности полученных нами линии-продуцентов, вычисленная по формуле производителя прибора Clone Pix, составляет 99.94%. При учете распределения колоний по радиусу и применении метода симуляции Монте-Карло уточненная вероятность моноκлональности составляет около 97.79%.

В результате проведенного анализа выявлено, что для расчета вероятности моноκлональности клеточных линий необходимо учитывать различные параметры: тип, морфологию и особенности клеточной культуры. Для достижения высокой вероятности моноκлональности получаемых клеточных линий за один этап клонирования необходимо придерживаться вышеописанных настроек, в противном случае необходимо проводить дополнительный этап клонирования – субклонирование.

В результате проведенных работ получена панель клонов-продуцентов, коэкспрессирующих рекомбинантные ферменты: целевой ASB и вспомогательный FGE (рис. 3). Более подробно принцип получения и оптимизация культивирования этих клеточных линий описаны в опубликованных работах авторов [8, 21].

Мы предполагаем, что для достижения более высоких значений вероятности моноκлонально-

**Таблица 1.** Вероятность получения моноклональной клеточной линии, рассчитанная по формуле ClonePix  
**Table 1.** Probability of obtaining a monoclonal cell line calculated using the ClonePix formula

N <sup>a</sup>	Вероятность моноклональности, %									
	Средний радиус отобранных колоний, мм									
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
10	99.97	99.88	99.73	99.52	99.26	98.93	98.54	98.10	97.59	97.03
20	99.94	99.75	99.44	99.00	98.43	97.74	96.92	95.98	94.92	93.72
30	99.90	99.62	99.14	98.47	97.61	96.55	95.31	93.87	92.24	90.42
40	99.87	99.48	98.84	97.94	96.78	95.36	93.69	91.76	89.57	87.12
50	99.84	99.35	98.54	97.41	95.95	94.17	92.07	89.64	86.89	83.82
60	99.81	99.22	98.25	96.88	95.13	92.98	90.45	87.53	84.22	80.51
70	99.77	99.09	97.95	96.35	94.30	91.80	88.83	85.41	81.54	77.21
80	99.74	98.96	97.65	95.83	93.48	90.61	87.21	83.30	78.86	73.91
90	99.71	98.82	97.35	95.30	92.65	89.42	85.60	81.19	76.19	70.60
100	99.67	98.69	97.06	94.77	91.83	88.23	83.98	79.07	73.51	67.30

*Примечание:* <sup>a</sup>Среднее число выросших колоний в лунке диаметром 35 мм.

*Note:* <sup>a</sup>The average number of grown colonies in a well with a diameter of 35 mm.

**Таблица 2.** Вероятность получения моноклональной клеточной линии, рассчитанная по методу Монте-Карло  
**Table 2.** Probability of obtaining a monoclonal cell line calculated using the Monte Carlo method

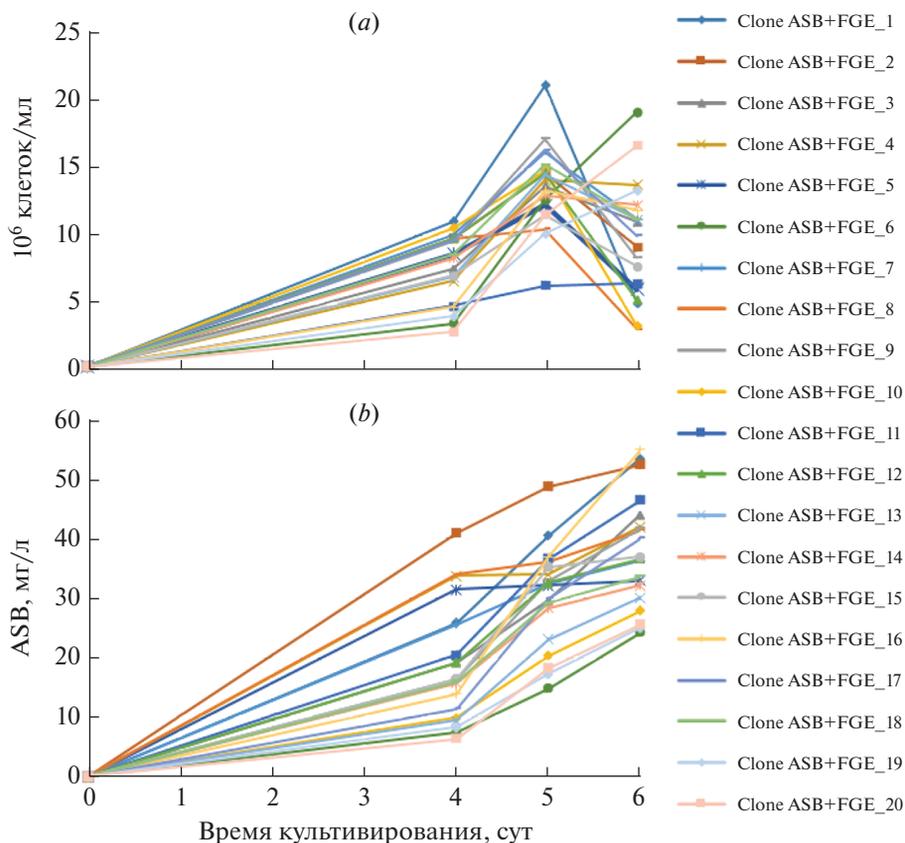
N <sup>a</sup>	Средний радиус отобранных колоний, мм									
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
10	99.89	99.53	98.96	98.21	97.04	95.98	94.40	93.01	91.25	89.23
20	99.74	99.06	97.79	96.17	94.03	91.72	88.83	85.78	82.67	78.89
30	99.61	98.48	96.70	94.19	91.38	87.69	83.64	79.18	74.39	69.75
40	99.50	98.02	95.52	92.37	88.29	83.72	78.57	73.22	67.40	61.63
50	99.37	97.45	94.52	90.53	85.62	80.17	73.83	67.54	60.92	54.48
60	99.24	97.01	93.34	88.66	82.94	76.47	69.37	62.23	55.20	48.21
70	99.10	96.51	92.37	86.75	80.30	73.03	65.46	57.60	49.93	42.65
80	98.95	95.98	91.28	85.08	77.72	69.83	61.53	53.09	45.23	37.76
90	98.85	95.55	90.19	83.35	75.28	66.68	57.85	49.14	40.84	33.45
100	98.72	94.94	89.10	81.66	72.95	63.69	54.43	45.39	36.94	29.58

*Примечание:* <sup>a</sup>Среднее число выросших колоний в лунке диаметром 35 мм.

*Note:* <sup>a</sup>The average number of grown colonies in a well with a diameter of 35 mm.

сти получаемых клеточных линий, помимо рекомендованных параметров исключения колоний при отборе, необходимо также заранее оптимизировать количество клеток, засеваемых в полутвердую среду при клонировании: таким образом, чтобы в 1 лунке 6-луночного планшета выросло не более 30 колоний клонов.

Разработанный метод вычисления вероятности моноклональности клеточных линий на основе метода Монте-Карло с применением скрипта, написанного с помощью языка статистического программирования R, позволяет учесть больше параметров и сформулировать более жесткие условия клонирования с целью повышения вероятности



**Рис. 3.** Анализ клонов-продуцентов ASB + FGE в течение 6 суток культивирования. (a) – Плотность жизнеспособных клеток; (b) – продуктивность.  
**Fig. 3.** Analysis of ASB + FGE producing clones during 6 days of cultivation. (a)—Density of viable cells (10<sup>6</sup> cells/mL); (b)—productivity (mg/L).

МОНОКЛОНАЛЬНОСТИ ПОЛУЧАЕМЫХ ЛИНИЙ ПРОДУЦЕНТОВ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ko P., Misaghi S., Hu Z., Zhan D., Tsukuda J., Yim M., Sanford M., Shaw D., Shiratori M., Snedecor B., Laird M., Shen A. Probing the importance of clonality: single cell subcloning of clonally derived CHO cell lines yields widely diverse clones differing in growth. *Biotechnol. Prog.*, 2017, 34(3), 624–634. <https://doi.org/10.1002/btpr.2594>
2. Lee J.S., Kildegaard H.F., Lewis N.E., Lee G.M. Mitigating clonal variation in recombinant mammalian cell lines. *Trends Biotechnol.*, 2019, 37(9), 931–942. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.02.007>
3. Lalonde M.E., Durocher Y. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *J. Biotechnol.*, 2017, 10(251), 128–140. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.028>
4. O’Flaherty R., Bergin A., Flampouri E., Mota L.M., Obaidi I., Quigley A., Xie Y., Butler M. Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: a review of the critical steps in their biomanufacturing. *Bio-technol. Adv.*, 2020, 43, 107552. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107552>
5. Zhou Y., Shaw D., Lam C., Tsukuda J., Yim M., Tang D., Louie S., Laird M.W., Snedecor B., Misaghi S. Beating the odds: the poisson distribution of all input cells during limiting dilution grossly underestimates whether a cell line is clonally-derived or not. *Biotechnol. Prog.*, 2018, 34(3), 559–569. <https://doi.org/10.1002/btpr.2560>
6. McKinnon K.M. Flow Cytometry: an overview. *Curr. Protoc. Immunol.*, 2018, 120, 5.1.1–5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
7. Ye M., Wilhelm M., Gentschev I., Szalay A.A. Modified limiting dilution method for monoclonal stable cell line selection using a real-time fluorescence imaging system: a practical workflow and advanced applications. *Methods Protoc.*, 2021, 4(1), 16. <https://doi.org/10.3390/mps4010016>
8. Тимонова С.С., Смолова К.А., Заринова 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>
9. Lai T., Yang Y., Ng S.K. Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals* (Basel), 2013, 6(5),

- 579–603.  
<https://doi.org/10.3390/ph605057>
10. *El Maï N., Donadio-Andréi S., Iss C., Calabro V., Ronin C.* Engineering a human-like glycosylation to produce therapeutic glycoproteins based on 6-linked sialylation in CHO cells. *Methods Mol. Biol.*, 2013, 988, 19–29.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-62703-327-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-327-5_2)
  11. *Boeger H., Bushnell D.A., Davis R., Griesenbeck J., Lorch Y., Stratian J.S., Westover K.D., Kornberg R.D.* Structural basis of eukaryotic gene transcription. *FEBS Lett.*, 2005, 579(4), 899–903.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.027>
  12. *Harmatz P., Hendriksz C.J., Lampe C., McGill J.J., Parini R., Leão-Teles E., Valayannopoulos V., Cole T.J., Matousek R., Graham S., Guffon N., Quartel A., MPS VI Study Group.* 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), 107–112.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.03.008>
  13. *Harmatz P., Lampe C., Parini R., Sharma R., Leão Teles E., Hawley S., Johnson J., Sivam D., Sisic Z.* Mucopolysaccharidosis type VI enzyme replacement therapy initiated in adulthood: findings from the MPS VI clinical surveillance program. *Mol. Genet. Metab.*, 2018, 123(2), S59.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.12.141>
  14. *Horovitz D.D.G., Leão E.K.E.A., Ribeiro E.M., Martins A.M., Barth A.L., Neri J.I.C.F., Kerstenetzky M., Siqueira A.C.M., Ribeiro B.F.R., Kim C.A., Santos F.C., Franco J.F.S., Lichtvan L.C.L., Giuliani L.R., Rodrigues M.D.C.S., Bonatti R.C.F., Teixeira T.B., Gonçalves A., Lourenço C.M., Pereira A.S.S., Acosta A.X.* Long-term impact of early initiation of enzyme replacement therapy in 34 MPS VI patients: a resurvey study. *Mol. Genet. Metab.*, 2021, 133, 94–99.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2021.02.006>
  15. *Solano M., Fainboim A., Politei J., Porras-Hurtado G.L., Martins A.M., Souza C.F.M., Koch F.M., Amartino H., Satizábal J.M., Horovitz D.D.G., Medeiros P.F.V., Honjo R.S., Lourenço C.M.* Enzyme replacement therapy interruption in patients with mucopolysaccharidoses: recommendations for distinct scenarios in Latin America. *Mol. Genet. Metab. Rep.*, 2020, 27(23), 100572.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2020.100572>
  16. *Garcia P., Phillips D., Johnson J., Martin K., Randolph L.M., Rosenfeld H., Harmatz P.* Long-term outcomes of patients with mucopolysaccharidosis VI treated with galsulfase enzyme replacement therapy since infancy. *Mol. Genet. Metab.*, 2021, 133(1), 100–108.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2021.03.006>
  17. *Appel M.J., Bertozzi C.R.* 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>
  18. *Mariappan M., Preusser-Kunze A., Balleininger M., Eisel N., Schmidt B., Gande S.L., Wenzel D., Dierks T., von Figura K.* Expression, localization, structural, and functional characterization of pFGE, the paralog of the Calpha-formylglycine-generating enzyme. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280(15), 15173–15179.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M413698200>
  19. *Bojarová P., Williams S.J.* Sulfotransferases, sulfatases and formylglycine-generating enzymes: a sulfation fascination. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2008, 12(5), 573–581.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.06.018>
  20. *Тимонова С.С., Павелко В.И., Кирик И.А., Бадэ В.Н., Малыгина Т.О., Хамитов Р.А., Пискунов А.А.* Принцип оперативного выбора лидерных клонов-продуцентов моноклональных антител при создании стабильных клеточных линий на основе CHO Биотехнология, 2019, 35(4), 65–72.  
<https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-4-65-72>
  21. *Тимонова С.С., Смолова К.А., Кирик И.А., Пантюшенко М.С., Анисимов Р.Л., Хамитов Р.А., Пискунов А.А., Бадэ В.Н.* Оптимизация условий культивирования клона-продуцента, коэкспрессирующего арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующей фермент, с целью повышения выхода фермента арилсульфатазы В. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*, 2022, 22(3), 279–292.  
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-279-292>

## Monte Carlo Method for Calculating the Probability of Monoclonality of Cell Lines

S. S Timonova<sup>a, #</sup>, V. I. Pavelko<sup>a</sup>, I. A. Kiric<sup>a</sup>, V. N. Bade<sup>a</sup>, A. A. Piskunov<sup>a</sup>, and R. A. Khamitov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>GENERIUM GSC, Volginsky, Vladimirskaya oblast', 601125 Russia

<sup>#</sup>e-mail: timonova1993@yandex.ru

**Abstract**—This study describes the generation of monoclonal producer clones using the ClonePix™ FL robotic system. CHO cells producing the enzyme arylsulfatase B (ASB) were used as an example. As the result, 20 leading clones producing the recombinant lysosomal enzyme ASB were selected. The probability of monoclonality calculated using the formula provided by the developers of the ClonePix™ FL system, was 99.94%. However, the probability of monoclonality calculated using the Monte Carlo method was 97.79%. The Monte Carlo method provided a more accurate estimate of the probability of monoclonality, allowing to make adjustments in the process of clone production and optimize cells seeding in a semi-solid medium by taking into account additional parameters. The probability of monoclonality of producer clones is a necessary parameter when registering a drug.

**Keywords:** mammalian cell line, Chinese hamster ovary cells, monoclonality, ClonePix™ FL, Monte Carlo method, monoclonality probability, arylsulfatase B, galsulfase