

- анализ нуклеотидных последовательностей клонированного гена и фланкирующих регуляторных областей экспрессионного вектора; идентификацию всех экспрессируемых последовательностей.

Схема получения штамма-продуцента и его характеристики должны быть документально подтверждены и включают следующее:

- методы введения вектора в клетку хозяина, отбор и клонирование трансформированных клеток;
- способы индуцирования экспрессии гена и ее контроля в процессе производства;
- методы, используемые для подтверждения включения вектора в клетку хозяина, например, с использованием различных рестриктаз, метода иммуноблоттинга (саузерн-блот), анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК;
- последовательность ДНК в клонированном гене подтверждают на стадии штамма-продуцента, ГБК и РБК;
- копийность, состояние и стабильность вектора в клетке-хозяине.

Стабильность генетических и фенотипических характеристик штамма-продуцента должна быть показана на материале, полученном до и после количества удвоений или количества пассажей клеток, ожидаемых при полномасштабном производстве. Данные должны включать сведения о проценте клеток, удерживающих экспрессирующую конструкцию, копийность гена, уровень экспрессии белка, характеристику рекомбинантного белка установленными методами и/или нуклеотидную последовательность гена (при использовании любого метода должен быть указан предел обнаружения отклонений от установленных параметров).

ПРОИЗВОДСТВО

Система банков клеток. Для получения рекомбинантного белка должна использоваться система банков клеток, которая обычно включает