

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. АКАДЕМИКОВ
М. М. ШЕМЯКИНА И Ю. А. ОВЧИННИКОВА РАН

На правах рукописи

БАЛАБАШИН ДМИТРИЙ СЕРГЕЕВИЧ

Оптимизация процессов селекции и культивирования клеток линии СНО,
продуцирующих рекомбинантные антитела против фактора некроза опухоли-
альфа человека

Специальность 1.5.4. Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители:

к. х. н. Алиев Теймур Кантамирович

д. б. н. Долгих Дмитрий Александрович

Москва — 2021

Оглавление

1	ВВЕДЕНИЕ	6
2	ОБЗОР И АНАЛИЗ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	11
2.1	Фактор некроза опухоли-альфа	11
2.2	Антитела против ФНО-а	13
2.3	Клеточные линии для продукции антител	15
2.4	Биплазмидная система экспрессии.....	16
2.5	Бипромоторная система экспрессии.....	18
2.6	Лимитирующий отбор культуры-продуцента.....	20
2.7	Цитосортировка	21
2.8	Селекция ClonePIX.....	22
2.9	Культивирование в капсулах и гранулах	25
2.10	Технология подкормки культуры	26
2.11	Разработка бессывороточной среды культивирования	27
3	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	33
3.1	Получение экспрессионных плазмид на основе векторов pcDNA3.3, pOptiVEC	35
3.2	Получение экспрессионных плазмид на основе pVtPr	37
3.3	Проведение рестрикции PstI и проверка полноты проведения линеаризации	41
3.4	Разморозка и подготовка исходной линии клеток CHO DG44 для трансфекции	42
3.5	Архивирование: заморозка аликвот клеток после трансфекции	42
3.6	Получение трансфектантов.....	42
3.7	Селекция клеток, продуцирующих антитела к ФНО-а человека.....	43
3.8	Капсуляция и грануляция клеток	44

3.9	Анализ внутриклеточного накопления тяжёлых и лёгких цепей с помощью проточной цитометрии.....	45
3.10	Цитосортировка	45
3.11	Высевание клеток для проведения автоматического отбора	46
3.12	Автоматизированный отбор колоний.....	46
3.13	Ведение клонов и селекция полученных клонов.....	47
3.14	Дополнительные этапы селекции	48
3.15	Проведение иммуноферментного анализа.....	48
3.16	Окраска клеток для проведения клеточной сортировки	49
3.17	Получение и очистка белковых компонентов бессывороточной среды	49
3.18	Получение небелковых компонентов бессывороточной среды.....	49
3.19	Приготовление гидролизатов растительных белков и контроль реакции...	50
3.20	Клеточная культура и адаптация для роста в базовой среде	51
3.21	Метод подпитки культуры CellBoost 7	51
3.22	Выделение и очистка препарата антител из культуральной среды	52
3.23	Проведение электрофоретического анализа хроматографических фракций антител ФНО-а человека.....	53
3.24	Определение концентрации ДНК и антител	53
4	РЕЗУЛЬТАТЫ.....	55
4.1	Получение экспрессионных плазмид и их линейаризация	55
4.2	Определение эффективности трансфекции	61
4.3	Сравнение культур на основе биплазмидной экспрессии.....	62
4.4	Цитосортировка	70
4.5	Внутриклеточная экспрессия лёгкой и тяжёлой цепей антитела в культурах S1 и S3	75
4.6	Разные комбинации экспрессионных плазмид	79
4.7	Эффект от увеличения концентрации МТХ свыше 500 нМ и введение дополнительных питательных веществ в ходе культивирования	81

4.8	Анализ и отбор клонов культуры	83
4.9	Ростовые диаграммы клонов	90
4.10	Оценка эффективности бипромоторной системы экспрессии.....	94
4.11	Выбор исходной культуры для дальнейшей селекции.....	94
4.12	Сравнение биплазмидной и бипромоторной систем экспрессии	96
4.13	Оптимизация среды культивирования	97
4.14	Получение и применение гидролизатов.....	102
4.15	Культивирование для получения продукта и введение подпитки культуры	
	107	
5	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	109
5.1	Микрокапсулирование	109
5.2	Цитосортировка	110
5.3	Разные комбинации экспрессионных плазмид	111
5.4	Параметры автоматизированного отбора колоний.....	116
5.5	Клональный анализ культур клеток	121
5.6	Сравнение эффективности стратегий отбора.....	122
5.7	Введение/разработка метода подкормки культуры	125
5.8	Оценка экономической эффективности производства подкормки	127
6	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	129
	Выводы	132
7	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:.....	133
8	БЛАГОДАРНОСТИ	145

Список сокращений:

СНО — линия клеток яичников китайского хомяка;

P_{CMV} — цитомегаловирусный промотор;

IRES — независимый сайт посадки рибосомы;

ТОРО — сайт для клонирования с топоизомеразой;

ТК pA — сайт полиаденилирования тимидинкиназы;

BGH — бычий гормон роста;

BGHT — терминатор бычьего гормона роста;

DHFR — ген дигидрофолатредуктазы;

pUC ori — начало репликации плазмиды;

P_{SV40} — промотор вируса SV40;

SV40 pA — сайт полиаденилирования вируса SV40;

hEF1-HTLV — промотор 1 фактора элонгации-1 α и часть концевой повтора U5-последовательности вируса Т-клеточной лейкемии человека;

EGFP — зеленый флуоресцентный белок;

ФНО- α — белок фактора некроза опухоли-альфа;

FITC — Fluorescein isothiocyanate, флуоресцеин изотиоцианат;

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота;

ФСБ — фосфатно-солевой буфер;

ДЭ — дрожжевой экстракт;

CaAlg — кальций-альгинат;

MFI — mean fluorescence intensity, среднее значение флуоресценции;

G418 — генетицин;

МТХ — меторексат.

1 Введение

За последние два десятилетия остро встала проблема получения высокопродуктивных штаммов микроорганизмов и клеточных линий, продуцентов биологически активных белковых рекомбинантных препаратов.

Мировой рынок биотехнологических препаратов демонстрирует рост за последние несколько лет, обусловленный появлением широкого спектра новых терапевтических белков (рекомбинантные антитела, факторы роста, ингибиторы коагуляции и другие), обладающих улучшенными характеристиками по сравнению со многими традиционными фармакологическими препаратами. Ожидается, что эта тенденция сохранится и в ближайшие годы, когда мировой рынок препаратов на основе антител сохранит темпы роста в 11,31% в год в период с 2020 года по 2025 год и достигнет 223,7 млрд. долларов США к концу прогнозируемого периода. В 2020 году рынок оценивался в 130,9 млрд. долларов США [1].

Одними из важнейших биотехнологических препаратов, зарегистрированных на рынке или находящихся в разработке, являются рекомбинантные терапевтические антитела. Для достижения увеличения выхода антител и снижения себестоимости препаратов на их основе постоянно совершенствуются методы и технические решения, позволяющие осуществлять селекцию клеток линий продуцентов. Существует несколько стратегий продукции антител в клетках млекопитающих, такие как транзистентная экспрессия, экспрессия в стабильных клеточных линиях, трансдукция лентивирусными частицами и другие. Для нужд фармацевтики в 70% случаев используют клеточные линии CHO [2, 3]. Основным направлением можно считать продукцию в стабильных линиях [4]. Данный подход позволяет исключить стадии трансфекции на каждом производственном цикле, повысить продукцию линии и

способствовать получению охарактеризованного белкового продукта из отдельного клона-суперпродуцента.

В качестве объекта для проверки экспрессионных стратегий в настоящей работе было выбрано антитело F10 [5]. Данное антитело имеет сродство к Фактору некроза опухоли-альфа человека (ФНО-а). Антитела против ФНО-а используются для терапии таких заболеваний, как ревматоидный артрит, псориаз, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит, болезнь Крона и других ФНО-а опосредованных заболеваний [6].

Для получения стабильной линии на основе иммортализованной линии клеток млекопитающих для продукции антител к ФНО-а обычно используют пару экспрессионных векторов, содержащих гены лёгкой и тяжёлой цепей антитела под контролем сильного промотора/энхансера в сочетании с геном устойчивости к селективному агенту. Подобная стратегия позволяет производить селекцию линии-продуцента с целью увеличения продукции рекомбинантных антител в среду культивирования. Для обеспечения возможности дальнейшего увеличения продукции линий клеток-продуцентов разработаны различные подходы, позволяющие эффективно отбирать наиболее продуктивные клетки из общего пула клеток и производить дальнейшие манипуляции только с ними. Эти подходы включают в себя сортировку на цитопоточном флуориметре [7-9], отбор колоний по уровню яркости, лимитирующее разведение, а также другие методы сортировки. Одним из наиболее современных и перспективных методов клонирования нового поколения является способ, основанный на использовании автоматических цитосортировщиков, позволяющих получать индивидуальные высокопродуктивные клоны стабильно продуцирующих линий клеток млекопитающих [10]. Другим вариантом увеличения продуктивности культуры клеток, стабильно продуцирующих антитела в среду культивирования, является применение контролируемого культивирования в высокой плотности с дополнительным питанием культуры [11, 12]

Основной целью данной работы является исследование способов повышения продуктивности биосинтеза антител в клеточных линиях на основе СНО DG44, дефицитной по гену дигидрофолатредуктазы *dhfr*, с применением двух групп экспрессионных плазмид, а также усовершенствованных методик культивирования.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработка бипромоторной экспрессионной конструкции;
2. Сравнение продуктивности биосинтеза антител на основе биплазмидной и бипромоторной конструкций в клетках СНО DG44 и осуществление нового подхода к селекции клонов-продуцентов;
3. Разработка эффективной методики культивирования стабильных продуцентов рекомбинантного антитела на примере химеризованного антитела F10 против Фактора Некроза Опухоли-альфа человека;
4. Оптимизация состава бессывороточной среды на основе рекомбинантных белков и гидролизатов белков неживотного происхождения.
5. Реализация стратегии fed-batch культивирования на стабильных продуцентах рекомбинантного антитела против Фактора Некроза Опухоли-альфа человека.

Научная новизна и практическая значимость:

1. Разработана бипромоторная конструкция для экспрессии рекомбинантных антител в клетках млекопитающих;
2. Выполнено сравнение эффективности двух вариантов биплазмидной и двух вариантов бипромоторных экспрессионных конструкций и их сравнение между собой;
3. Разработана эффективная методика культивирования стабильных продуцентов на примере химеризованного антитела F10 против Фактора Некроза Опухоли-альфа человека;

4. Разработана бессывороточная среда культивирования на основе белков, полученных из неживотных источников;
5. Разработана эффективная схема подкормки культуры клеток-продуцентов на основе произведенного гидролизата белков неживотного происхождения;

Методология и методы диссертационного исследования:

В ходе выполнения диссертационной работы использован комплекс генно-инженерных, молекулярно-биологических, иммунохимических методов исследования, а также работа с культурами клеток.

Положения, выносимые на защиту

1. Создание двух групп генетических конструкций, содержащих гены легкой и тяжелой цепей антитела к ФНО-а с применением пары генетических маркеров в одном случае и единственного маркера в другом позволяют сравнить эффективность экспрессии антитела к ФНО-а.
2. Разработана оптимальная стратегия селекции линий клеток, полученных с использованием двух групп векторных конструкций и установлены максимальные концентрации селективных агентов.
3. Показано влияние клонального отбора линий на ускорение роста продуктивности каждой из них, оценена его эффективность.
4. Произведена разработка технологии получения гидролизатов белков неживотного происхождения, предложена стратегия подкормки и восстановления состава питательной среды в ходе наработки белкового продукта полученными линиями клеток.
5. Реализована стратегия подкормки, способная раскрыть биотехнологический потенциал клеточной культуры с максимизацией выхода целевого антитела.

Личный вклад диссертанта

Экспериментальные данные, представленные в настоящей работе, получены автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование, выполнение экспериментов, обработку полученных данных, а также оформление и публикацию результатов.

Связь с государственными программами

Диссертационная работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-773).

Степень достоверности

Достоверность результатов, представленных в диссертационной работе, определяется репрезентативным объемом проведенных экспериментальных исследований, комплексным применением современных методов исследования и подтверждается статистической обработкой полученных данных.

Апробация результатов

Результаты работы были представлены в качестве докладов или стендовых сообщений на следующих научных мероприятиях: Гены & Клетки XIV (СПб, 2019), Международный форум "Биотехнологии: состояние и перспективы развития. Науки о жизни" (Москва, 2018), Спецвыпуск Acta Naturae (Москва, 2017), The 7th PEGS Europe Protein & Antibody Engineering Summit (Lisbon, Portugal, 2015), XXV Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, Россия, 2013), XXIII Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, Россия, 2011).

Публикации

Были опубликованы 4 статьи в журналах из перечня ВАК, получено 3 патента на изобретение. Кроме того, материалы и результаты диссертационной работы были представлены на 6 международных конференциях.

2 Обзор и анализ литературных источников по теме исследования

2.1 Фактор некроза опухоли-альфа

Фактор некроза опухоли-альфа человека (ФНО, фактор некроза опухоли-альфа, кахексин, кахектин, англ. tumor necrosis factor, TNF) является провоспалительным цитокином, продуцируемым преимущественно моноцитами и макрофагами в растворимом виде.

В отличие от растворимой формы ФНО-а, трансмембранная форма цитокина обладает некоторыми уникальными функциями, такими как цитотоксическая активность и поликлональная В-клеточная активация [13]. Антитела против растворимой и трансмембранной формы ФНО-а человека представляют новые подходы к терапии псориатического артрита, болезни Крона, псориаза и других воспалительных кожных заболеваний вроде болезни Бехчета и гангренозной пиодермии [14-17], также высокие уровни ФНО-а в крови могут провоцировать развитие глаукомы [18].

Фактор некроза опухолей альфа (ФНО-а) является мощным провоспалительным цитокином, который опосредует гомеостаз иммунных реакций [19]. ФНО-а человека, главным образом продуцируемый активированными макрофагами, может индуцировать миграцию нейтрофилов хемотаксисом в сосудистой эндотелии, что способствует воспалительному процессу [20], а также стимулировать зависимые от концентрации проапоптотические клеточные функции [21]. Таким образом, ФНО-а играет ключевую роль в патогенезе хронических и иммуно-опосредованных воспалительных заболеваний [22, 23]. В настоящее время известно, что фактор, описанный как некротический, индуцирует апоптоз посредством активации каспаз [21, 24] и также может вызывать некроптоз [25]. Однако в некоторых клеточных линиях ФНО-а может стимулировать пролиферацию клеток, играя роль в выживании и дифференцировке клеток [26-29]. Основными клиническими

состояниями, связанными с дерегулированным увеличением провоспалительных цитокинов, таких как ФНО-а, являются бактериемия, сепсис, отторжение трансплантированных тканей и хронические воспалительные заболевания, такие как ревматоидный артрит (РА), региональный энтерит (болезнь Крона), рассеянный склероз, астма, псориаз, гломерулонефрит, хроническая обструктивная болезнь легких и анкилозирующий спондилоартрит [22, 30].

Принимая во внимание участие ФНО-а в инфекционных, аутоиммунных и иммуномодулированных процессах, были разработаны антагонисты для контроля усугубленного иммунного ответа. Терапевтические антагонисты ФНО-а способны избирательно нейтрализовать биологическую функцию цитокина, что приводит к ремиссии клинических симптомов нескольких хронических аутоиммунных и воспалительных заболеваний (таблица 1). Изменчивость ответа, наблюдаемая у пациентов, чрезвычайно велика, и различные биологические препараты против ФНО-а могут играть эффективную альтернативу в случаях низкой эффективности или в вопросах безопасности, связанных с традиционным лечением стероидами или синтетическими антимаболами [31]. Начиная с 2008 года в руководящих принципах Американского колледжа ревматологии содержатся рекомендации по использованию биологических агентов в новых и ранних случаях РА, а обновленное руководство 2015 года обсуждает использование биологических ингибиторов ФНО и синтетических наркотиков в нескольких различных условиях [32, 33], [34].

Потеря эффективности часто упоминается как основная причина прекращения лечения с применением анти-ФНО-а антител [35, 36], в таких случаях альтернативные лекарства позволяют сменить терапевтическое средство и продолжить лечение [31].

2.2 Антитела против ФНО-а

Рекомбинантные химерные, гуманизированные или полностью человеческие антитела относятся к активно развиваемому высокоэффективному сегменту фармацевтических препаратов биологического происхождения [37]. Возрастающая роль рекомбинантных антител в терапии онкологических, аутоиммунных, инфекционных заболеваний требует разработки производительных способов их биосинтеза в клеточных линиях млекопитающих.

В конце 90-х годов была продемонстрирована клиническая эффективность первого полностью человеческого анти-ФНО-а-адалимумаба, первоначально называемого D2E7. Adalimumab был разработан BASF Pharma для лечения РА и в настоящее время производится Abbvie Inc. (Humira®) для различных аутоиммунных и воспалительных заболеваний, включая РА, ювенильный идиопатический артрит (ЮИА), псориатический артрит, бляшковидный псориаз, анкилозирующий спондилоартрит, болезнь Крона, язвенный колит, неинфекционный увеит и гнойный гидраденит [38]. Задачей получить человеческое антитело против человеческого ФНО-а (аутоантитело) было отсутствие сродства к эндогенной молекуле, преодоленное через технологию фагового дисплея. Предварительные испытания показали способность D2E7 нейтрализовать функциональную активность ФНО-а в трансгенной мышечной модели для предотвращения полиартрита в обработанной группе, которая оставалась свободной от клинических и гистопатологических признаков заболевания [39]. Клинические исследования продемонстрировали безопасность и эффективность лечения РА с адалимумабом, демонстрируя значительное улучшение симптомов болезни [40, 41]. Более поздние клинические данные подтверждают устойчивую эффективность адалимумаба для лечения пациентов с РА в течение 5 лет наблюдения [42], также сохраняется в других клинических условиях [43-45]. Продажи анти-ФНО-а-препаратов демонстрируют успешность терапии, такие препараты как adalimumab являются всемирно признанными в

медицине и приносили более 10 миллиардов долларов в год даже через 10 лет после утверждения FDA и EMA [46].

Высокая стоимость импортированных фирменных биологических препаратов на развивающихся рынках приводит к расходованию значительной части государственного бюджета здравоохранения, несмотря на то, что биологические препараты составляют лишь 2–3% от общего объема медикаментов. Этот сценарий в сочетании с истечением срока действия патентов мАт блокбастеров, таких как Humira, ускорил гонку за разработку и производство дженериков.

Некоторые антитела против ФНО-а человека, такие как Этанерцепт, Адалimumаб, Инфликсимаб, Голимумаб и Цертализумаб, имеющие свойство нейтрализации растворимой формы ФНО-а, были допущены FDA для клинического применения [2]. Эффективность различных антагонистов ФНО-а различается для различных заболеваний [47, 48]. Так, Этанерцепт не эффективен в отношении гранулематоза, где ФНО-а представлен в трансмембранной форме и играет ключевую роль [49]. Тем не менее разработка нового антагониста ФНО-а позволяет по новому взглянуть на механизм антителопосредованной клеточной цитотоксичности ADCC, комплемент зависимой цитотоксичности CDC, апоптотических и других сигнальных механизмов [13, 49-52]. Клеточные линии млекопитающих являются хорошим выбором для продукции рекомбинантных антител из-за их схожести на человеческие клетки. Человеческие белки не всегда хорошо производятся в таких распространенных системах экспрессии как бактерии или дрожжи [53]. Колоректальный рак (КРР) является вторым наиболее распространенным злокачественным новообразованием в Саудовской Аравии [54]. Во всем мире КРР является третьим наиболее распространенным раком у мужчин, а вторым у женщин [55]. Колоректальная опухолевая ткань содержала много положительных клеток ФНО-а, тогда как нормальная колоректальная ткань содержала очень мало положительных клеток. В исследовании была показана [18] повышенная экспрессия гена ФНО-а раковыми клетками, которые сильно

коррелировали с развитыми стадиями опухолей. Высокие уровни экспрессии ФНО-а могут быть независимым прогностическим показателем, а внимание к уровню ФНО-а может быть перспективным инструментом, который может использоваться для наблюдения за пациентами с колоректальной карциномой [18].

2.3 Клеточные линии для продукции антител

Для продукции антител в клетках эукариот чаще всего используют клеточные линии CHO DG44 [56], GS-NS0 [56, 57], HEK293, HEK293-EBNA [58, 59], Per.C6 [60, 61] адаптированные для суспензионного роста, а также некоторые другие суспензионные и монослойные культуры [53]. Из всех клеточных культур, CHO клетки наиболее приспособлены для биотехнологических нужд. Данная клеточная культура с лёгкостью может быть адаптирована для суспензионного выращивания в питательной среде определенного состава без добавления сыворотки. Предложенное сочетание является предпочтительным для биофармацевтических компаний, так как обеспечивает высокую скорость пролиферации, высокую удельную скорость продукции антител и устойчивость к механическому стрессу. Белки, продуцируемые клеточными линиями на основе CHO, корректно гликозилированы и имеют правильную конформацию [62]. Описанные особенности являются важными для высокой растворимости белков, активности, и продолжительности циркулирования в кровеносном русле при введении пациенту [62-64]. Стабильная экспрессия целевого гена в клетках стабильной эукариотической культуры позволяет избежать использования транзientной экспрессии и предоставляет возможности оптимизации и масштабирования условий получения продукта. Уровень продукции рекомбинантных антител в стабильных линиях клеток зависит от наличия эффективных генетических маркеров селекции в векторах, селективных агентов,

селекции родительской линии клеток, взятой за основу линии-продуцента, и культуральной среды [65]. Для некоторых антител продукция может достигать 2 г/литр [66]. Максимальная продукция для культуры полученной на основе НЕК293, продуцирующей в бессывороточной среде экспрессии варьируется от 20 до 1000 мг/л [67]. В литературе сообщается о типичных уровнях продукции для GS-NS0 равных от 40 до 2700 мг/л среды [4, 66, 67]. Для линий клеток, полученных на основе СНО в зависимости от среды культивирования в пределах 503–863 мг/мл [68] и 3–5,8 г/л в ходе ведения стабильной культуры fed-batch [69]. Такие серьёзные различия в уровне продукции целевых белков клетками стабильных линий обуславливаются широкой вариативностью полученных продуцентов, продукта клеточных линий, степенью адаптации, доступностью аминокислот в культуральных средах и возможностью использования таких базовых компонентов как аминокислоты, глюкоза, глутамин, пируват натрия, а также концентрацией ростовых факторов в среде культивирования. В некоторых случаях уровень транскрипции и трансляции целевых белков обусловлен выбором экспрессионного вектора и линии клеток, а также специфичностью самого белка для экспрессии и его особенностями.

2.4 Биоплазмидная система экспрессии

Клеточная линия, продуцирующая антитело, может быть создана с использованием пары различных выбираемых маркеров [70]. В случаях, когда два селективных маркера использовались для отбора стабильных антителопродуцирующих клеточных линий, селективные маркеры расположены либо в одном экспрессионном векторе, содержащем гены для тяжелой цепи и легкой цепи, или на двух отдельных плаزمидях, каждая из которых содержит либо ген тяжелой, либо легкой цепи под управлением соответствующего маркера селекции.

Векторные конструкции для успешной экспрессии в клетках млекопитающих обычно содержат единую кассету, включающую в себя ген лёгкой или тяжёлой цепи антитела и селективный маркер, другая кассета в составе того же вектора отвечает за репликацию вектора в клетках бактерий. Для получения высокого уровня экспрессии в клетках млекопитающих используются сильные промоторы/энхансеры такие как цитомегаловирусный промотор CMV [71] и фактор элонгации-альфа EF1 α [72]. Данные регуляторные элементы используются в составе векторов для контроля экспрессии генов лёгкой и тяжёлой цепей целевого антитела. Также в состав экспрессионных векторов включают 5'-нетранслируемый регион после промотора/энхансера для увеличения эффективности выхода транскрибированной мРНК в цитоплазму из ядра и один или несколько 3' сигналов полиаденилирования для увеличения концентрации мРНК.

Широко используемой является также последовательность сигнала полиаденилирования из промотора SV40 и последовательность полиаденилирования из BGH. Для успешной трансляции и секреции используют консенсусную последовательность Козака [73], создают, помещая GCC GCC(A/G)CC непосредственно перед первым кодоном инициации трансляции для усиления инициации трансляции, тогда как сигнальная пептидная последовательность помещается непосредственно перед пептидом зрелого антитела для прямой секреции антитела [74].

Для стабильного введения векторной ДНК в клетки млекопитающих было разработано множество методов трансфекции, включая кальций-фосфатную преципитацию, электропорацию, катионоактивную липофекцию и методы на основе полимеров или дендримеров [75]. Все четыре метода используются для стабильной трансфекции, но электропорация и липофекция являются наиболее распространенными вариантами. После трансфекции трансфицированные клетки выбирают, полагаясь на различные селективные маркеры, которые можно разделить на две группы: метаболические селективируемые маркеры и

антибиотические селективные маркеры. К наиболее активным метаболическим относятся DHFR (Dihydrofolate reductase) и GS (Glutamine synthase), а к антибиотическим — гены устойчивости к зеоцину и неомицину (G418).

Метотрексат является специфическим ингибитором DHFR, и клетки, которые приобретают устойчивость, как правило, подвергаются амплификации гена *dhfr* в сайте интегрированного вектора, содержащего ген *dhfr* [76].

Промотор-энхансер цитомегаловируса CMV [77] человека является сильным и повсеместно применяемым промотором, одним из самых известных промоторов-энхансеров млекопитающих [78]. Сила промотора CMV делает его популярным для экспрессии коммерческих рекомбинантных антител в клетках млекопитающих, часто клеток CHO, где высокие выходы желательны для рентабельного производства рекомбинантных препаратов белков и антител [79, 80].

2.5 Бипромоторная система экспрессии

Типичная схема белковых препаратов для терапии заболеваний человека включает в себя использование вектора, включающего в себя последовательность гена с регуляторными элементами и ген устойчивости *dhfr*, как наиболее удобный и эффективный для проведения процедуры селекции. Вектора, содержащие ген цепи антитела и ген устойчивости могут быть внесены в клетки вместе или по отдельности, но встраивание произойдет в одни и те же локусы хромосом клеток культуры [81]. Для независимого эквимолярного увеличения количества генов цепей антитела в составе последовательностей интегрированных в геном клетки применяют систему из двух генов, находящихся под контролем единого селективного маркера [82]. Бипромоторные конструкции показали свою эффективность [83]. Андерсеном и соавторами было отмечено, что использование в одном векторе двух разнонаправленных промоторов CMV (один из которых был модифицирован) повышает продуктивность целевого антитела относительно контроля в виде немодифицированных промоторов CMV.

Использование сильных промоторов является важным параметром для экспрессии мАт в клетках СНО. Хотя CMV является наиболее часто используемым промотором для продуцирования рекомбинантного белка в клетках СНО, в нескольких исследованиях описывается его потенциальное затухание и инактивация [84]. Выделенный из клеток СНО промотор фактора элонгации 1-альфа (СНЕF-1) был описан как перспективный инструмент для экспрессии высоких уровней в клетках млекопитающих по сравнению с другими видами промоторов [72].

Важным компонентом кассеты экспрессии является промотор, который способствует повышению уровня экспрессии и стабильности экспрессии трансгенов [85]. Обычно используемым промотором для экспрессии рекомбинантного белка в клетках млекопитающих является цитомегаловирус (CMV) цитомегаловируса (CMV), основной немедленный ранний (МІЕ) [86, 87]. Хотя CMV дает высокий уровень экспрессии генов, существуют исследования, демонстрирующие восприимчивость этого промотора к заглушению. Метилирование последовательности CMV, вызванное эпигенетическими событиями, может привести к уменьшению продукции антител [84, 88]. С другой стороны, СНО-специфические конститутивные промоторы также являются хорошими кандидатами. Было показано, что промотор фактора элонгации 1-альфа СНО (СНЕF-1) является успешной системой для получения высокого уровня экспрессии в клетках млекопитающих [72].

Помимо разработки оптимальной экспрессирующей кассеты с сильным промотором, которая является общей для всех рекомбинантных белков, существует еще одна проблема для производства мАт, которую следует учитывать [87]. Наиболее распространенные типы мАт на рынке, иммуноглобулин класса G (IgG), состоят из двух идентичных легких цепей (LC) и двух идентичных полипептидов тяжелой цепи (HC). Поэтому сбалансированное соотношение легкой и тяжелой цепей оказывает большое влияние на оптимальную продукцию рекомбинантного IgG в клетках млекопитающих. Как

правило, рекомбинантная экспрессия мАт достигается либо путем совместной трансфекции двух отдельных векторов, каждый из которых кодирует одну цепь антител, либо трансфекцией одного вектора, кодирующего обе цепи. Во избежание конкуренции между одинаковыми промоторами, возможно создание векторных конструкций с разнонаправленными ориентациями промоторов генов различных цепей целевого антитела [89]. По данным приведенного исследования, применение разнонаправленных одноптипных промоторов для лёгкой и тяжёлой цепей антитела может быть эффективнее пары векторных конструкций, каждая из которых несёт одинаковые промоторы [90]. Однако, в нескольких исследованиях показано, что использование одного вектора обеспечивает более жесткий контроль над отношением экспрессии LC/HC [87, 91, 92].

Совместная экспрессия тяжелых и легких цепей под контролем одного промотора может быть достигнута с использованием либо вирусного участка внутренней посадки рибосом (IRES), либо вирусных 2А-самореактивных последовательностей [93]. Когда элемент IRES вводится между двумя открытыми рамками считывания (ORF), первая ORF транслируется через кэп-зависимый механизм. Считывание второй ORF после элемента IRES инициируется через кэп-независимый механизм, который опосредуется через последовательности IRES [94, 95]. Тем не менее, независимый от IRES трансляционный сдвиг менее эффективен, чем кэп-зависимая трансляция [96].

2.6 Лимитирующий отбор культуры-продуцента

Клонирование методом лимитирующего разведения исторически используется для изолирования клеток культуры СНО. Однако, такой метод требует больших временных затрат исследователя и не всегда даёт гарантию получения истинного моноклона из поликлональной культуры клеток. С помощью данного метода невозможно точно разделить на первоначальном этапе высокопродуктивные клоны от непродуктивных, так, при применении метода

лимитирующего разведения, анализ культуры возможен только после достижения ею определённой плотности. Эффективность метода напрямую зависит от количества клонов, которое может быть реально исследовано [97-99].

2.7 Цитосортировка

В ходе получения стабильной линии экспрессии клетки линии трансфицируются с помощью рекомбинантных векторов, содержащих интересующие исследователя гены цепей антитела. Для выявления и изоляции тех клеток, которые имеют наибольшую продуктивность в составе этого гетерогенного клеточного пула необходимо оценивать клоны культуры или колонии, образованные отдельными клетками культуры-продуцента. Доля супер-продуцентов низка в таких гетерогенных популяциях, и искомые клоны, как правило, имеют более низкие частоты удвоения. Таким образом, культура постепенно теряет гетерогенность за счёт клонов супер-продуцентов, энергия которых расходуется на производство белкового целевого продукта, а не на рост [100, 101]. Поэтому важно изолировать клоны, представляющие интерес, и соответственно был разработан ряд методов отбора и отбора. Клонирование клеток путем серийного разведения является слепым тестом, который требует выделения клонов без предварительного знания производительности. Несмотря на то, что этот метод достаточно прост, этот метод является трудоемким, требующим значительного тестирования после изоляции преимущественно клонов с низким и средним уровнем продуктивности. Репортерные гены с низкой токсичностью, такие как GFP, могут быть включены в векторную кассету для информирования об уровне белковой продукции конкретного клона и уменьшения количества клонов, которые необходимо оценить. Однако, поскольку ген GFP сохраняется в ходе тестирования и отбора, и получения белкового продукта, в процесс производства необходимо ввести дополнительные этапы, чтобы исключить удаление секретируемого GFP из препарата получаемых антител [101]. Появление

технологии FACS позволило разработать протоколы, которые значительно упрощают процесс отбора клонов. FACS — это эффективный метод, который позволяет быстро и высокопроизводительно анализировать отдельные клетки в гетерогенной популяции. Продуктивность каждой клетки сначала косвенно анализируется, и это знание определяет, можно ли отобрать каждую конкретную клетку. Только клетки, которые достигают predetermined порога, будут отобраны и добавлены в общий пул продуцентов, что значительно уменьшает ненужное постсортировочное тестирование более продуктивных клеток. Был разработан ряд методов, позволяющих FACS оценивать продуктивность клеток. Рекомбинантные антитела после продукции в клетках линий млекопитающих транспортируются в культуральную среду. Часть экспрессируемых антител остаётся на мембране клеток и может быть детектирована в ходе проведения окрашивания. Флуоресцентно меченое вторичное антитело, специфическое к рекомбинантному антителу, продуцируемому клетками линии может использоваться для связывания эпитопов белкового продукта и обеспечения приблизительной количественной оценки продуктивности. Другие методы используют более прямые подходы к захвату секретируемого продукта на поверхности клетки с использованием пористых матриц или методов холодного захвата [77, 102]. Было показано, что повторная сортировка высокоэффективных субклонов резко снижает количество анализируемых скринингклонов более чем в десять раз, а продолжительность разработки клеточной линии — более чем на 50% [103]. Подобная техника может обеспечить увеличение продуктивности получаемых клонов в 25-120 раз относительно материнской линии клеток [103].

2.8 Селекция ClonePIX

В данной работе реализован метод отбора клеток СНО, продуцентов химеризованных антител к ФНО-а, с использованием автоматического

цитосортировщика клеток ClonePix FL, визуализированных с помощью вторичных флуоресцентно-меченых антител.

Система ClonePix FL представляет собой автоматизированную систему отбора стабильных клонов продуцентов из массы рассеянных клеток. После проведения компьютерного анализа полученных снимков система автоматически переносит выбранные клоны из 6-луночных в 96-луночные планшеты. Использование в составе системы флуоресцентных источников освещения для эффективной работы системы ClonePix FL определяет необходимость использования полутвёрдых сред и помеченных иммуноглобулинов к продукту клеточной линии. В случае моноклональных антител возможно использование антител против лёгкой или тяжёлой цепей иммуноглобулина. Миграция меченых вторичных антител в сторону источника большего количества рекомбинантных антител обеспечивает идентификацию лучших клонов-продуцентов за счет большего ореола свечения вокруг их колоний.

Данная система позволяет производить отбор кандидатов из клеток культуры, из которых настоящими суперпродуцентами являются лишь 1–2%. Колонии таких продуцентов обладают более интенсивной флуоресценцией и большими по размеру ореолами флуоресценции. Продукция клеточных линий на основе данных клонов существенно превосходит продукцию базовой культуры и колоний с менее интенсивной флуоресценцией.

Для сокращения продолжительности исследования культуры на наличие продуцирующих клонов и выделения достаточно моноклональных культур из родительской культуры зачастую применяют метод проточной цитометрии [7-9]. Несмотря на сложность проведения такого анализа и сортировки, а также дороговизну необходимого оборудования, данный метод предпочтительнее метода лимитирующего разведения и перспективнее его в части скорости отделения высокопродуктивных клонов от непродуктивных. Это объясняется тем, что это метод отбора клонов непосредственно оценивает продуктивность клеток на основе экспрессии поверхностного белка на поверхности одной клетки.

Несмотря на это, метод проточной цитометрии ограничен отбором групп клеток на основании уровня экспрессии белков, обнаруженных на их поверхности.

Методика обнаружения клонов культуры на основании экспрессии целевого белка культуры не является, однако, удовлетворительно работающей в отношении культур, специализированных на экспрессии белка в среду культивирования. Некоторые исследователи считают, что нет значимой связи между уровнем поверхностной экспозиции белков на поверхность клеток гибридома и её экспрессией целевого белка в среду культивирования в растворимом виде [104]. Несмотря на выработанную схему проведения отбора с применением проточной цитометрии, некоторыми исследователями предпринимаются попытки усовершенствовать и унифицировать технологию получения. Для этих целей в вектор для экспрессии целевого белка вводится ген GFP или CD20 в качестве индикаторного. Такой подход позволяет выявлять хорошую корреляцию между экспрессией целевого гена и индикаторного белка [105]. В этом случае клетки получают дополнительную нагрузку по экспрессии маркерного белка. Другие улучшения включают в себя использование гелевых микросфер и биотин-авидиновую матрицу для анализа секреции проточном цитометре [106]. Метод гелевых микрокапель требует дополнительного оборудования для создания микрокапель, а также подбора множества условий для точного дозирования количества клеток в каждой из капель. Также биотин-авидиновая технология требует оптимизации биотинилирования, так как количество аминов на клеточной поверхности может значительно различаться.

Полутвёрдая среда позволяет удерживать секретируемые белки вблизи секретирующих их клонов культуры [10, 107]. Также полутвёрдая среда имеет достаточную вязкость для удержания клеток исследуемой культуры и незначительные диффузии молекул секретируемого ею белка. Текстуру среде придаёт обычно легкоплавкая агароза или метилцеллюлоза. Метил целлюлоза является более предпочтительной добавкой в среду для текстурирования, так как более химически инертна. Клетки делятся в полутвёрдой среде с образованием

колоний, представляющих собой потомство одной единственной клетки, то есть моноклональны. Секретированный клетками белковый продукт остается в пределах небольшой радиальной зоны вокруг колонии. Ключевой особенностью полутвёрдой среды является возможность визуальной оценки уровня продукции целевого белка клонами по уровню взаимодействия белкового продукта и антитела к нему, находящегося в среде. Для этого роботизированная система отбора посредством камеры определяет относительную продуктивность каждого клона из единичной клетки на основании его размера, формы и близости соседних колоний на чашке на основании данных, полученных при видимом свете, и его относительную продуктивность на основании изображений полученных при флуоресцентном источнике освещения [10, 108-110]. Полученные изображения объединяются программно и анализируются по программе заданной исследователем.

Селекция высокопродуктивных клонов является важным этапом в продукции терапевтически активных антител. Комбинация варианта клонирования индивидуальных групп клеток, полученных из единственной клетки культуры-продуцента и полутвёрдой среды, является эффективной стратегией селекции линий продуцентов [10, 108, 110]. Однако детальная процедура такой комбинации с бессывороточно адаптированными клетками СНО и эффективными условиями отбора клонов еще не устоялась [109].

2.9 Культивирование в капсулах и гранулах

Другим подходом является культивирование клеток в суспензии и в полимерных микрогранулах/микрокапсулах. Биосовместимые полимерные микрокапсулы для иммобилизации клеток животных были впервые предложены в начале 1980-х годов, и в настоящее время микрокапсулирование клеток широко применяется в биомедицине и биотехнологии [111, 112].

Структура капсул позволяет обособить клеточную массу от супернатанта и упростить процедуру отбора среды при полном сохранении клеточной массы для дальнейшего культивирования. Для культуры, инкапсулированной с применением данной технологии лучше всего подойдёт перфузионный способ выращивания. При использовании капсул для ограничения клеточной массы, возможно производить манипуляции с культурой клеток без использования центрифугирования. Данное обстоятельство позволяет снизить риск контаминации культуры при проведении процедуры перфузии.

2.10 Технология подкормки культуры

В настоящее время стала широко распространённой технология подкормки культуры в ключевые моменты роста с целью продления времени экспрессии целевого белка и увеличения его финальной концентрации в супернатанте культуры. Процесс культивирования клеток с методом подкормки (fed-batch) предлагает высокую объемную производительность при низкой эксплуатационной сложности [113]. В периодическом процессе с базовой для культуры средой базовая среда поддерживает начальный рост клеток, а среда с дополнительной подкормкой предотвращает истощение питательных веществ, расширяя фазу продуктивного роста. Параметры процесса, такие как температура, рН, pO_2 и скорость перемешивания, определяют физическую среду, в то время как выбор среды для выращивания, подкормки и стратегии кормления определяют химическую среду, подходящую для производства целевого белка. Контроль питательных веществ обычно выполняется вручную, с использованием автономного анализа питательных веществ и болюсных кормов, вводимых через 24 ч [114, 115]. В попытке улучшить контроль процесса и уменьшить вариации от партии к партии коммерческие производители применяют сенсорные технологии, такие как масс-спектрометрия и рамановскую спектроскопию, которые позволяют проводить онлайн-измерения характеристик клеток, а также концентрации

питательных веществ и побочных продуктов [116]. Внедрение таких методов как «качество через дизайн» (quality-by-design, QbD) улучшает развитие сложных систем управления и способствует более глубокому пониманию процесса. Масштабируемые модели обычно используются для скрининга сырья и параметров в характеристике процесса, что позволяет передавать процесс сначала в пробный, а затем и в производственный масштаб. Часто подход к разработке эксперимента (quality-by-design, DOE) (например, метод Plackett-Burman и методология поверхности реагирования) применяются для определения оптимальных концентраций питательных веществ или параметров процесса, которые максимизируют титры и качество продукта [117]. Производители вкладывают значительные средства в разработку сред и оптимизацию процессов, поскольку их необходимо выполнять индивидуально для каждой клеточной линии [118].

2.11 Разработка бессывороточной среды культивирования

Увеличение выхода рекомбинантного белка и, следовательно, снижение издержек производства относится к основной биотехнологической цели [119]. Поскольку производительность клеток млекопитающих более низкая, чем прокариотических, существует стратегия увеличения производства рекомбинантного белка в клетках СНО, включающая регулирование температуры культуры [120, 121], добавление различных химических веществ [121], контроль параметров в биореакторе [122] и ингибирование клеточного апоптоза [123, 124]. Температура культивирования линии-продуцента является одним из наиболее важных параметров, при этом такие клетки животных, как СНО, для имитации окружающей среды организма наиболее часто культивируются при 37°C. Температура и рН среды культивирования [125-127] и содержание в ней растворенного кислорода (DO) [125, 127] влияют на некоторые важные клеточные характеристики (рост, жизнеспособность и синтез белка), которые были изучены для определения подходящих условий процесса производства белка [128]. Для

выращивания клеток традиционно использовались смеси компонентов, включающие растворы основных питательных веществ для обеспечения метаболизма клеток, которые получили название базовых (MEM, DMEM, IMDM, RPMI-1640, 199 и др.). Базовые питательные среды имеют различный состав. Для роста клеточной массы в них необходимо добавлять сыворотку крови. Ее традиционно вносят в культуры клеток, чтобы обеспечить их гормонами, факторами роста, связывающими и транспортными белками, а также другими дополнительными питательными веществами. Однако сывороточные композиции не постоянны и их состав, как правило, не известен. Для жизнеспособности культуры клеток необходима лишь небольшая часть входящих в сыворотку компонентов.

Соединения, входящие в состав сыворотки, при культивировании могут влиять на жизнеспособность и пролиферацию клеточной массы, тем самым внося существенные погрешности при экспрессии целевого белка в линиях этих клеток [129]. Содержание белка в сыворотке обычно намного больше, чем уровень его экспрессии клеточной линией-продуцентом. При этом сывороточные белки могут легко маскировать присутствие продукта специфической экспрессии линии-продуцента при анализе в том случае, если они схожи с ними по размеру. Таким образом, биотехнологическая промышленность для точного воспроизведения результатов экспрессии требуемых белков и облегчения процедуры очистки наработанного препарата остро нуждается в отсутствии сыворотки в питательных средах. Ее удаление из среды культивирования позволит исключить сывороточные гормоны, антитела и другие регуляторы, а также унифицировать состав питательной среды, что позволит достоверно изучить клеточную физиологию и иммунологию, межклеточные взаимодействия и кинетику накопления продукта линии-продуцента. Использование свободной от сыворотки среды значительно снижает также риск контаминации культуры. Следовательно, продукты, полученные из культуры клеток – продуцентов рекомбинантных

белков, не содержащей сыворотку, становятся привлекательными при применении во многих областях, особенно *in vivo* при лечении человека.

Основными белками, необходимыми клеткам культуры СНО для успешного роста, являются альбумин, инсулин и трансферрин, а из неорганических добавок – селенит натрия. Данные вещества входят в состав среды, свободной от сыворотки, и выполняют ряд специализированных функций. Так, альбумин служит в качестве носителя не только для незаменимых жирных кислот и некоторых минералов (например, ионов цинка), но и гормонов, а также факторов роста пептидов. Он осуществляет детоксикацию H_2O_2 [129] и избыточных количеств микроэлементов [130] [131], а также обеспечивает механическую защиту клеток при перемешивании [132]. Концентрация альбумина в разных средах, свободных от сыворотки, составляет от 0,5 до 5,0 мг/мл. Для приготовления сред используют две различные формы альбумина, первая – представляет собой экстракт нативного сывороточного альбумина, ассоциированного с жирными кислотами неопределенной природы, а вторая - делипидированный альбумин (более очищенные среды), связанный с линолевой и олеиновой кислотами. Однако такие препараты являются дорогостоящими, поэтому для крупномасштабных производств моноклональных антител (мАт) их использование нецелесообразно. Все большее число исследователей культивируют клетки в отсутствие альбумина, но этот подход возможен не для всех линий клеток и гибридом.

Инсулин служит фактором роста и поддержания оптимального метаболического уровня клетки, и считается важным компонентом в культуре гибридом, свободных от сыворотки. Он способствует стимуляции поглощения аминокислот (особенно лейцина и валина) клетками культуры, а также уридина и глюкозы, ответственных за синтез РНК, белка и липидов. Инсулин включается в большинство бессывороточных сред в концентрациях от 5 до 10 мкг/мл.

Трансферрин считается одной из основных добавок, стимулирующих рост клеток гибридом в бессывороточной среде [133, 134], но в некоторых случаях его отсутствие приводит к сильному ингибированию их роста. Трансферрин является

гликопротеином, связывающим железо и облегчающим его транспорт через плазматическую мембрану [135, 136], он используется в бессывороточной среде в диапазоне концентраций 1-30 мкг/мл. При этом трансферрин взаимодействует с определенными рецепторами клеточной поверхности [135, 136] и может обладать *in vitro* такими дополнительными функциями как хелатирование токсичных металлов, содержащихся в малых и следовых количествах [137]. В зависимости от производителя и состава коммерческие добавки инсулина и трансферрина их обозначают *insulin-trasferrin-selenium-ethanolamine* (ITSE), *selenium-insulin-transferrin-ethanolamine* (SITE), *insulin-trasferrin-selenium-sodium pyruvate* (ITS-A), *insulin-trasferrin-selenium-ethanolamine* (ITS-G) или *insulin-trasferrin-selenium* (ITS). Другие их различия включают сведения, является ли продукт рекомбинантным, не содержащим животных экстрактов, или полученным из тканей животных, или донорской крови. Большинство продуктов, называемых на рынке инсулин-трансферрин-селенит натрия, содержат белки, полученные из крови, включающие бычий трансферрин или трансферрин из плазмы человека, а также свиной инсулин. Однако существует несколько композиций рекомбинантных инсулина и трансферрина, полностью не содержащих животных добавок, которые предлагают компании «InVitria» и «Thermo» (США). Остальные композиции содержат нативные белки и не свободны от продуктов животного происхождения [138]. Их цена, часто основанная на стоимости других составляющих, может различаться. Разработка концентрата, состоящего из растворов белков, имеющих рекомбинантную природу и структуру, полностью сходную с белками человека, позволит добиться высокого уровня безопасности. Следует отметить, что при терапии препаратами, полученными на основе бессывороточных сред с рекомбинантными белками-добавками, исключается вероятность заражения больного вирусами животных. В свою очередь замена коммерческой среды позволит снизить затраты на получение целевого IgG1 линией-производителем, и таким образом снизить себестоимость фармацевтических препаратов, получаемых в результате биосинтеза в клеточных линиях-производителях.

В настоящее время успешно применяется несколько композиций и добавок для бессывороточных сред культивирования широкого спектра эукариотических клеток, и, в частности, клеток линий СНО. Однако необходимо отметить, что различные клеточные линии, полученные из исходной линии СНО, имеют специфический метаболизм и особенности использования питательных элементов. Известно, что при высокой плотности клеток продукция рекомбинантных антител может снижаться из-за истощения среды культивирования, и вследствие этого рост культуры замедляется и останавливается, а культура погибает. С гибелью культуры останавливается специфическая продукция. В фармацевтической индустрии особую трудность промышленного культивирования представляет оптимизация уровня экспрессии иммуноглобулинов в СНО клетках. Данная особенность связана со сложностью синтеза длинных аминокислотных последовательностей лёгкой и тяжёлой цепей, входящих в состав полноразмерного антитела, и последующей за этим его сборки из отдельных цепей полноразмерных молекул антитела. Поэтому клеточные линии, продуцирующие IgG1, из-за сложностей в сборке полноценных молекул, показывают более низкую продукцию по сравнению с клетками-продуцентами других рекомбинантных белков. Для улучшения роста клеток и, как следствие, увеличения продукции ими терапевтических белков использовали внесение в бессывороточную среду добавок, содержащих гидролизаты белков растительного происхождения [139]. Такой подход позволил разработать стратегию добавления этого гидролизата в бессывороточную среду культивирования [140].

Согласно данным литературы гидролизаты дрожжей способствуют значительному приросту продуктивности клеток линии СНО в культуре [141]. Ряд других исследований подтверждает способность таких гидролизатов увеличивать плотность клеток СНО в процессе культивирования и специфическую продуктивность их линий [142, 143].

При выборе источника сырья широко используются гидролизаты растений и дрожжей, поскольку они исключают применение в биофармацевтике в качестве

добавок в среду культивирования продуктов животного происхождения [144-146]. Было показано, что источник этих гидролизатов влиял на рост клеток и продукцию ими целевого белка [147]. Известен также ряд коммерческих добавок, включающих гидролизаты растительного происхождения. Данные добавки являются комплексными, однако состав таких композиций относится к коммерческой тайне.

Рекомбинантная низкобелковая среда позволила бы заменить дорогостоящие питательные среды и добавки, а применение компонентов неживотного происхождения избежать контаминации вирусами и иными опасными агентами при получении рекомбинантного IgG1 в клетках CHO.

3 Материалы и методы

МАТЕРИАЛЫ

В работе использованы следующие расходные материалы: 96-луночные ИФА-планшеты Nunc MaxiSorp (Nunc, Дания); микроцентрифужные пробирки объемом 0,2, 0,5, 1,5 и 2,0 мл (SSI, США); пробирки для центрифугирования объемом 15 мл и 50 мл (Greiner Bio One, США); чашки Петри одноразового применения стерильные (Greiner Bio-One, Германия), культуральные флаконы и планшеты для суспензионных культур различных объёмов (Greiner Bio-One, Германия), фильтры нитроцеллюлозные с порами диаметром 0,22 мкм (Millipore, США), PVDF фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (Millipore, США), пипетки серологические одноразовые 1, 5, 10, 25 и 50 мл (Eppendorf, Германия), концентраты Amicon Ultra 30K (Ирландия).

В работе использовали следующие реактивы: акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, хелатирующая IDA-сефароза (все Amersham Pharmacia Biotech, США); глицерин, соли и буферы квалификации «хч» и «осч» (Реахим, Россия), трис-гидроксиметиламинометан (трис), 2-меркаптоэтанол, этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), бычий сывороточный альбумин (БСА), персульфат аммония, додецилсульфат натрия (SDS), имидазол, эндонуклеазы рестрикции: MluI, NheI, XhoI, Sall, PvuI, XbaI, KpnI, PstI, ApaI, Phe19I (Fermentas, США), T4-ДНК-лигаза, маркеры молекулярных масс ДНК и белков (Fermentas, США), праймеры M13/pUC 46F и M13/pUC 46R (Fermentas, Литва); ДНК-полимераза Tersus (Евроген, Россия); ДНК-полимераза Taq (Евроген, Россия); щелочная фосфатаза (Сибэнзим, Россия). Также были использованы бакто-агар, триптон, дрожжевой экстракт (Becton, Dickinson and Company, США); дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (Fermentas, США); IPTG (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид), агароза, Tween-20 (Helicon, Россия), X-

Gal (5-Бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид), ампициллин, все растворы готовили на воде MilliQ.

Штаммы *E. coli* XL1-Blue (a, b 3 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proABlacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]) (Stratagene, США) и TG1 (supE thi-1 delta(lac-proAB) delta(mcrB-hsdSM)5(rK- mK-) [F' traD36 proAB lacIqZdeltaM15]) (Novagen, США).

Буферные растворы

Буфер TAE: 50 mM Трис-ацетат (pH 8.0), 20 mM ацетат натрия, 2 mM ЭДТА.

Трисглициновый буфер: 0,025 M Трис-HCl pH 8,4, 0,192 M глицин, 0,1% SDS.

Буфер для нанесения белковых образцов -2-ME (pH 6,8): 60% глицерин, 5 mM β- меркаптоэтанол, 10% SDS, 250 mM Трис-HCl.

Буфер для нанесения белковых образцов +2-ME (pH 6,8): 60% глицерин, 10% SDS, 250 mM Трис-HCl.

ФСБ (pH 7.3): 1,47 mM KH_2PO_4 , 4,29 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 137 mM NaCl, 2,68 mM KCl.

Буфер для диализа ФСБ: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,76 mM KH_2PO_4 , pH 7,4.

Все буферы растворяли в воде milliQ и доводили pH 1M HCl или 1M NaOH.

Микробиологические среды

Среда LB: 1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,5% хлорид натрия.

Агаризованная среда LB: 1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,5% хлорид натрия, агар до концентрации 1,5%.

(Все среды автоклавировались в течение 45 мин при давлении 0,2 МПа и хранилась при комнатной температуре.)

Эукариотические среды и реактивы

Питательная среда DMEM, IMDM (Биолот, Россия), питательная среда RPMI 1640, питательные среды CD DG44 и OptiCHO (Invitrogen, США), раствор

пенициллин-стрептамицин-фунгизон (Anti-anti, x100, Invitrogen, США), и L-глутамин, генетицин (Gibco, США), метотрексат (Верофарм, Россия), фетальная телячья сыворотка FB1001-500 (BioSera, Франция), добавки для подкормки CellBoost 7a и CellBoost 7b (Hyclone, США), параформальдегид (Sigma-Aldrich, США), Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США), мышинные моноклональные IgG против каппа человека (Polygnost, Россия), вторичное антитело против мышинового IgG-FITC (SantaCruz, Даллас, США), поликлональное кроличье антитело против Fc человека, меченное фикоэритрином (SantaCruz, США).

Исходные векторные конструкции: pOptiVEC, pcDNA3.3 (Invitrogen, США), pBudCE4 (ThermoFischer, США), pMG, pBlueScriptSK (Stratagene, США).

Олигохитозан (ММ 3500, степень деацетилирования 89%) [148], полученный химической деструкцией коммерческого высокомолекулярного хитозана (ММ 1200 кДа, Sigma-Aldrich, Германия) был любезно предоставлен проф. А. Бартковиакон (Западнопомеранский университет, г. Щецин, Польша).

МЕТОДЫ

3.1 Получение экспрессионных плазмид на основе векторов pcDNA3.3, pOptiVEC

Создание промежуточной рекомбинантной плазмидной ДНК pOpti-F10L-MluI

В вектор pOptiVEC-ТОРО из набора pOptiVEC-ТОРО TA Cloning Kit (Invitrogen) с помощью синтетического олигонуклеотидного дуплекса Plink (**Таблица 1**) вводили сайты узнавания рестриктаз NheI и XhoI и после лигирования и трансформации клеток *Escherichia coli* отбирали клоны с правильной ориентацией дуплекса. Выделяли плазмидную ДНК из клонов и анализировали рестрикционным анализом. Отбирали плазмидные ДНК, содержавшие нужный набор рестрикционных фрагментов. Определяли нуклеотидную последовательность отобранных ДНК и окончательно отбирали плазмидные ДНК, в которых нуклеотидная последовательность между

промотором CMV и IRES (в сайте TOPO) содержала последовательность дуплекса Plink в нужной ориентации.

Из экспрессирующей библиотеки кДНК, полученной на основе мРНК мышинной гибридомы F10, продуцирующей антитела к ФНО-альфа человека, ранее Б.В. Радько и др. были выделены и охарактеризованы клоны, содержащие гены переменных областей тяжелой и легкой цепей антитела к ФНО-альфа человека [5].

С помощью метода ПЦР на матрице хромосомной ДНК человека получали фрагменты, содержавшие гены константных областей легкой (каппа) и тяжелой (IgG1) цепей антитела человека.

Кодирующую последовательность химерной легкой цепи получали методом SOE-ПЦР со специфическими олигонуклеотидными праймерами, с помощью которых на 5'-конец гена вводили сайт узнавания рестриктазы NheI, а на 3'-конец - сайт XhoI. После обработки ПЦР-фрагмента соответствующими рестриктазами кодирующую последовательность легкой цепи химерного антитела F10 клонировали в вектор pOptiVEC с введенными сайтами узнавания рестриктаз NheI и XhoI.

Отбирали плазмидные ДНК, содержащие нужный набор рестрикционных фрагментов. Определяли нуклеотидную последовательность отобранных клонов промежуточной рекомбинантной плазмидной ДНК pOpti-F10L секвенированием по двум цепям по методу Сэнгера.

Сайт Sall в позиции 17 плазмиды pOpti-F10L заменяли на сайт MluI для введения гена тяжелой цепи антитела вместе с промотором и сайтом полиаденилирования. Для этого плазмиду pOpti-F10L обрабатывали рестриктазами PvuI и XbaI, продукты реакции разделяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле, фрагменты PvuI-XbaI 1,247 и 3,930 т.п.о. вырезали из геля и

выделяли. Фрагмент PvuI-XbaI 3,930 т.п.о. оставляли в качестве вектора. Фрагмент PvuI-XbaI 1,247 т.п.о. обрабатывали рестриктазой SalI и фрагменты PvuI-SalI 0,551 т.п.о. и SalI-XbaI 0,696 т.п.о. очищали электрофорезом и выделением из геля.

Праймер MluI-1 фосфорилировали и отжигали сам на себя. Фрагменты PvuI-XbaI 3,930 т.п.о., PvuI-SalI 0,551 т.п.о. и SalI-XbaI 0,696 т.п.о. соединяли с олигонуклеотидом MluI-1 при помощи лигазной реакции. Плазмидную ДНК отобранных клонов выделяли и отбирали по наличию сайта узнавания рестриктазы MluI. Окончательно структуру промежуточной рекомбинантной плазмидной ДНК р361 подтверждали определением нуклеотидной последовательности в области встроенного фрагмента, содержащего сайт узнавания рестриктазы MluI.

3.2 Получение экспрессионных плазмид на основе pBiPr

Конструирование промежуточной плазмиды рSK-EF1-chimF10H-BGH

Гибридный промотор hEF1-HTLV, фланкированный сайтами узнавания рестриктаз KpnI и MluI на 5'-конце и NheI на 3'-конце, амплифицировали на матрице плазмиды рMG. Прохождение реакции и количество фрагмента контролировали по появлению в продуктах реакции при разделении их электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле фрагмента длиной 0,566 т.п.о.

Полученный в результате ПЦР фрагмент длиной 0,566 т.п.о., содержащий гибридный промотор hEF1-HTLV, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NheI и KpnI, из полученного гидролизата выделяли фрагмент ДНК длиной 0,550 т.п.о.

Сигнал полиаденилирования гена фактора роста быка BGH polyA, фланкированный сайтами узнавания рестриктаз NheI и XhoI на 5'-конце и MluI и PstI на 3'-конце, амплифицировали на матрице плазмиды рBudCE4.1.

Прохождение реакции и количество фрагмента контролировали по появлению в продуктах реакции при разделении их электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле фрагмента длиной 0,255 т.п.о.

Полученный в результате ПЦР фрагмент длиной 0,255 т.п.о., содержащий сигнал полиаденилирования гена фактора роста быка BGN polyA, обрабатывали рестриктазами NheI и PstI, из полученного гидролизата выделяли фрагмент ДНК длиной 0,247 т.п.о. после электрофоретического разделения в 1,5%-ном агарозном геле.

Плазмидную ДНК pBlueScriptSK+ (Stratagene) обрабатывали рестриктазами KpnI и PstI, из полученного гидролизата выделяли линейаризованную плазмидную ДНК длиной 2,910 т.п.о. после электрофоретического разделения в 0,8%-ном агарозном геле.

Векторную часть pBlueScriptSK+/KpnI-PstI 2,910 т.п.о., фрагмент KpnI-NheI длиной 0,550 т.п.о., содержащий гибридный промотор hEF1-HTLV, и фрагмент NheI-PstI длиной 0,247 т.п.о., содержащий сигнал полиаденилирования гена фактора роста быка BGN polyA, сшивали при помощи лигазной реакции и клонировали. Плазмидную ДНК отобранных клонов выделяли и отбирали рестриктным анализом по наличию двух сайтов узнавания рестриктазы MluI (наличие в продуктах реакции фрагмента длиной 0,785 т.п.о.). Окончательно структуру промежуточной рекомбинантной плазмидной ДНК pSK+/hEF1-HTLV-BGN подтверждали определением нуклеотидной последовательности в области встроенных фрагментов секвенированием по методу Сэнгера с олигонуклеотидными праймерами M13-20 и M13R (**Таблица 1**).

Таблица 1. Структура использованных олигонуклеотидов

Название	Структура олигонуклеотида	Длина, нуклеотидов
Plink1	5' – AGCTAGCGTACGTGTACATTCGAATTCATCGATATCCGC GGAGCGCTCGAG–3'	51
Plink2	5' – ACTCGAGCGCTCCGCGGATATCGATGAATTCGAATGTAC ACGTACGCTAGC–3'	51
CMV forward	5' –CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG–3'	21
EMCV IRES reverse M	5' –GCCTTATTCCAAGCGGCTTCGG–3'	22
MluI-1	5' –TCGAGACGCGTC–3'	12
CMVrev1	5' –CGCGGAACTCCATATATGGGCTAT–3'	24
pOpti-4319- 4343	5' –CAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGAT–3'	23
EF-1F	5' –CCAGGTACCACGCGTCGCTCCGGTGCCCGTCAG–3'	33
HTLV-R	5' – CCAGCTAGCTGATCTCAGGTAGGCGCCGGTCACAGC–3'	36
BGHF	5' – <u>CCCGCTAGCCTCGAGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAG</u> – 3'	35
BGHR	5' – <u>CCCCTGCAGACGCGTCCATAGAGCCCACCGCATC</u> – 3'	34
M13-20	5' –GTAAAACGACGGCCAGT–3'	17
M13R	5' –CAGGAAACAGCTATGAC–3'	17

С помощью метода ПЦР на 5'- и 3'-конец гена варибельной области тяжелой цепи антитела вводили сайты узнавания рестриктаз *NheI* и *ApaI*, соответственно. Аналогично на 5'- и 3'-конец гена константной области тяжелой цепи антитела человека вводили сайты узнавания рестриктаз *ApaI* и *XhoI*. После обработки соответствующими рестриктазами оба фрагмента совместно сшивали с фрагментом длиной 3,701 т.п.о., полученным из предобработанной рестриктазами *NheI* и *XhoI* плазмидой pSK+/hEF1-HTLV-BGH при помощи лигазной реакции и клонировали. Плазмидную ДНК полученных клонов выделяли и отбирали рестриктным анализом по наличию двух сайтов узнавания рестриктазы *MluI* (наличие в продуктах реакции фрагмента ДНК длиной 2,325 т.п.о. по сравнению с 0,785 т.п.о. в случае плазмиды pSK+/hEF1-HTLV-BGH), а также по наличию в продуктах гидролиза рестриктазами *NheI* и *XhoI* фрагмента длиной 1,546 т.п.о., содержащего ген тяжелой цепи химерного антитела F10 к ФНО-альфа человека. Окончательно структуру промежуточной рекомбинантной плазмидной ДНК pSK-EF1-chimF10H-BGH подтверждали определением нуклеотидной последовательности в области встроенных фрагментов секвенированием по методу Сэнгера с олигонуклеотидными праймерами M13-20 и M13R (Таблица 1).

Конструирование рекомбинантной плазмиды pViPr-ABTNF

Рекомбинантную плазмидную ДНК p361 обрабатывали рестриктазой *MluI*, из полученного гидролизата выделяли линейаризованную плазмидную ДНК длиной 5,189 т.п.о. после электрофоретического разделения в 0,8%-ном агарозном геле.

Промежуточную рекомбинантную плазмидную ДНК pSK-EF1-chimF10H-BGH обрабатывали рестриктазой *MluI*, из полученного гидролизата выделяли фрагмент ДНК длиной 2,325 т.п.о. после электрофоретического разделения в 1%-ном агарозном геле.

Векторную часть плазмидной ДНК p361/MluI длиной 5,189 т.п.о. и MluI/MluI - фрагмент ДНК длиной 2,325 т.п.о., включающий в себя гибридный промотор hEF1-HTLV из плазмиды pMG, ген тяжелой цепи химерного антитела F10 к ФНО-альфа человека и сигнал полиаденилирования гена фактора роста быка BGN polyA из плазмиды pBudCE4.1, сшивали при помощи лигазной реакции и клонировали. Плазмидную ДНК полученных клонов выделяли и отбирали рестриктным анализом по наличию двух сайтов узнавания рестриктазы MluI (наличие в продуктах реакции фрагмента ДНК длиной 2,325 т.п.о. по сравнению с 0,785 т.п.о. в случае плазмиды pSK+/hEF1-HTLV-BGN). Ориентацию встроенного фрагмента определяли с помощью метода ПЦР с олигонуклеотидными праймерами CMVrev1 и HTLV-R. Окончательно структуру рекомбинантной плазмидной ДНК pViPr-ABTNF подтверждали определением нуклеотидной последовательности секвенированием по методу Сэнгера с олигонуклеотидными праймерами pOpti-4319-4343 и CMVrev1 (состав праймеров приведен в **Таблице 1**).

3.3 Проведение рестрикции Ple19I и проверка полноты проведения линеаризации

Генетические конструкции, содержащие гены легкой и тяжелой цепей антитела очищали на аффинных колонках Midiprep (Invitrogen, США). Затем проводили рестрикцию рестриктазой Ple19I из расчета 1 единица фермента на 1 мкг ДНК. Реакцию проводили в буфере, рекомендованном производителем, в течение 1 ч при температуре 37°C. После проведения рестрикции качество и полноту процедуры рестрикции проверяли электрофоретически. Рестрицированную ДНК подвергали второму этапу очистки с помощью аффинных колонок, с тем, чтобы избавиться от примесей белка. Количество образца и качество очистки проверяли спектрофотометрически. Электрофорез проводили в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия 0,2 мкг/мл. В

качестве буфера использовали ТАЕ: 50 мМ Трис-ацетат (рН 8,0), 2 мМ ЭДТА, 20 мМ ацетат натрия,

3.4 Разморозка и подготовка исходной линии клеток CHO DG44 для трансфекции

Аликвоту, равную 1×10^7 клеток/мл культуры клеток CHO DG44, замороженную и хранящуюся при -196°C , размораживали при 37°C и наращивали в 20–30 мл полной среды CD DG44 (Invitrogen, США). За 48 ч до трансфекции клеточную линию рассевали до концентрации 3×10^5 клеток/мл. За 24 ч до трансфекции клетки вновь рассевали до концентрации 3×10^5 клеток/мл.

3.5 Архивирование: заморозка аликвот клеток после трансфекции

Для криоконсервации использовали 1×10^7 клеток/мл в 1 мл среды, в которой выращивались клетки с добавлением 10% ДМСО (DMSO, Sigma). Хранение замороженных аликвот культуры осуществляли при -196°C в жидком азоте.

3.6 Получение трансфектантов

Для получения стабильного продуцента рекомбинантных антител к ФНО-а человека проводили трансфекцию клеток яичника китайского хомячка CHO DG44 (*dhfr* -/-) парой плазмид OptiVEC-LC и pcDNA 3.3-НС для культуры S3, и плазмидой pViPr-ABTNF для культуры S11. Культивирование клеток CHO DG44 проводили в среде CD DG44 (Invitrogen, США) (94,2%) с добавлением 8 мМ L-Глутамин (4%), 1,8% Pluronic F-68 (Invitrogen, США). Во флаконы Эрленмейера объемом 125 мл засеивали 6×10^6 клеток в 30 мл клеточной суспензии при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере с частотой 130 об/мин и через 20 ч–24 ч проводили трансфекцию с использованием реагента Freestyle MAX (Invitrogen, США). Плазмидную ДНК добавляли к клеткам в виде ДНК-

липосомного преципитата. Преципитат готовили следующим образом: при комнатной температуре во флакон вносили 18 мкг ДНК плазмиды в 1200 мкл среды OptiPRO SFM (Gibco, США), перемешивали, добавляли 15 мкл реагента Freestyle MAX. Затем перемешивали пипетированием, инкубировали 15 минут при комнатной температуре. После инкубации вновь перемешивали пипетированием и по каплям вносили в культуральный флакон. Флакон с культурой инкубировали при температуре 37°C, 98% влажности, в атмосфере 8% CO₂ и непрерывном перемешивании 130 об/мин на орбитальном шейкере ELMi S3 (Латвия).

3.7 Селекция клеток, продуцирующих антитела к ФНО-α человека

Перед селекцией был проведен анализ уровня экспрессии клеток линий с различными комбинациями векторов с помощью метода ИФА.

В случае культуры S3 селекцию продуцирующей линии проводили в 3 этапа: первым этапом селекции было переводение культуры на среду OptiCHO, через 2 недели культивирования вторым этапом — добавление в среду OptiCHO селективный антибиотик G418 в концентрации 500 мкг/мл. Данный этап селекции занял также 2 недели. Третьим этапом было постепенное увеличение концентрации MTX. Селекцию MTX начинали с минимальных концентраций MTX и увеличивали в до следующего значения после прохождения предыдущего этапа и восстановления скорости удвоения популяции. Каждый из этапов селекции продолжался до момента достижения культурой скорости удвоения популяции равной 24 ч при жизнеспособности не менее 95%. В случае культуры S11 этап селекции G418 пропусклся.

При достижении устойчивости культур S3 и S11 к метотрексату в концентрации 5 нМ было проведено клонирование культуры на оборудовании ClonePIX FL (Genetix, Великобритания). После каждого этапа селекции с помощью метотрексата был проведен клональный анализ культуры с

использованием автоматической системы отбора колоний. Данная система позволяет анализировать пул рассеянных клеток и отбирать претендентов для последующего выращивания.

3.8 Капсуляция и грануляция клеток

Клеточный преципитат (6×10^7 клеток), полученный после центрифугирования клеточной массы при 900 об/мин в течение 5 мин был растворён в 2 мл стерильного альгината натрия 1,3%. Затем данная смесь была добавлена к раствору хлористого кальция 0,5% с применением электростатического генератора гранул оригинальной конструкции. Полученные гидрогелевые CaAlg микрогранулы инкубировали в 0,2% растворе олигохитозана в течение 10 мин для формирования гранулярной поверхности. Микрогранулы отмывались трижды в ФСБ, половина переводилась в среду культивирования.

Для получения полых микрокапсул микрогранулы инкубировались в 50 мМ EDTA в течение 10 минут, отмывались трижды в ФСБ и переводились в среду культивирования. В результате микрокапсулирования из клеточной линии СНО S3 было получено 1,5 мл микрокапсул и 1,5 мл гранул на 30 мл среды для каждого из повторов эксперимента, что соответствовало плотности 3×10^5 клеток/мл культуральной среды. В качестве контроля использовали суспензионную культуру СНО S3.

Аликвоты среды (500 мкл) собирали каждые 2 дня. Культуральную среду с микрокапсулами и микрогранулами, а также контрольную суспензионную культуру центрифугировали, после чего отбирали супернатант для проведения ИФА для оценки концентрации антител. Клетки обрабатывали трипановым синим для определения количества жизнеспособных клеток. Содержание живых клеток в микрокапсулах и микрогранулах определяли после механического их разрушения путем ресуспендирования через иглу шприца.

3.9 Анализ внутриклеточного накопления тяжёлых и лёгких цепей с помощью проточной цитометрии

Для определения внутриклеточного синтеза тяжёлых и лёгких цепей в клеточных линиях S3 и S1 клетки фиксировали 4% параформальдегидом (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 минут при 37°C, центрифугировали и пермиебилизировали с 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США) в PBS в течение 30 мин. Аликвоты окрашивали мышинным моноклональным IgG против каппа человека (Polygnost, Российская Федерация), затем вторичным антителом против мышинового IgG-FITC (SantaCruz, Даллас, США) и поликлональным кроличьим антителом против Fc человека, помеченным фикоэритрином (SantaCruz, Даллас, США). Неокрашенные или окрашенные вторичными антителами клетки использовали в качестве контроля. Клетки анализировали с помощью FACScan (Becton Dickinson, США), оснащенного CellQuest. Всего было собрано и проанализировано 5000 событий с помощью бесплатного программного обеспечения WinMDI 2.8. Для сравнения живые клетки также были помечены той же парой антител, чтобы проверить мембранную экспрессию цепей антитела.

3.10 Цитосортировка

Для проведения процедуры сортировки брали линию клеток, предварительно прошедшую все необходимые этапы для достижения устойчивости к метотрексату в концентрации 500 нМ. Клетки, готовые к сортировке имели жизнеспособность на уровне 95% или выше и период удвоения популяции короче 24 ч. Перед произведением окрашивания клетки отмывали и центрифугировали дважды при 800 об/мин в ФСБ. Окрашивание клеточной массы производили на льду при температуре +4°C в ФСБ. Окрашивание производили в течение 1 ч. Для окрашивания 1×10^6 клеток берут 1 мкг вторичных антител, конъюгированных с FITC, в буфере без азида натрия, вносили к клеточной массе и ресуспендировали пипетированием. После проведения процедуры окрашивания массу клеток центрифугировали и отмывали от буфера со вторичными

антителами дважды в буфере ФСБ pH=7,4, а затем переносили в полную ростовую среду. При сортировке в качестве контроля использовали клетки линии СНО DG44, не имеющие специфической экспрессии белка в среду культивирования. Сортировку проводили 91+ на клеточном сортировщике FACS Diva (Becton Dickinson, США).

3.11 Высевание клеток для проведения автоматического отбора

Для проведения автоматического отбора клетки рассеивали в полутвёрдую среду, в которой присутствовали все необходимые для роста клеток компоненты. В состав среды входили антитела к продукту, который вырабатывается клетками. Для этого во флаконе емкостью 100 мл смешивали 90 мл Semi-Solid Media for СНО, 4 мл (200 мМ L-глутамин, 1 мл CloneDetect (MolecularDevices, Великобритания) в концентрации 1 мг/мл, 1 мл генетицина (500 мкг/мл) и 2 мл воды. К этим антителам должны быть ковалентно пришиты флуоресцирующие молекулы (FITC, GFP, RFP или другие). В случае если клетки стабильно трансфицированы плазмидой, кодирующей лёгкую и тяжёлую цепи антител, такими антителами были вторичные антитела к тяжёлой цепи антитела, продуцируемого клетками.

Для проведения анализа культуры на наличие клеток суперпродуцентов и отбора наиболее перспективных из них, клеточную культуру рассеивали в полутвёрдую среду и растили в течение 10–14 дней в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) при максимальной влажности для уменьшения испарения питательной среды.

3.12 Автоматизированный отбор колоний

Анализ и отбор колоний культуры продуцента осуществляли на ClonePIX FL (Genetix, Великобритания) стальной полый иглой с диаметром канала равным 0,4 мм, что гарантировало выделение и забор индивидуального клона и отсутствие контаминации другими клонами. Клетки были отобраны

автоматически после начала процедуры по трём ключевым параметрам при флуоресцентном освещении. Контроль изъятия колоний клеток из полутвёрдой среды осуществлялся с помощью серии из двух кадров для каждого из мест забора. Колонии отбирались по 8 единиц за один микроцикл работы и были перенесены в 96-луночный планшет. После переноса в планшет с трехкратным ресуспендированием иглы проходили процедуру обеззараживания 70% раствором этанола и высушивались принудительно. Каждая отобранная колония являлась потомством одной отдельной клетки и переносилась в индивидуальную лунку 96-луночного планшета.

3.13 Ведение клонов и селекция полученных клонов

После проведения клонирования клетки индивидуализированных клонов помещали в лунки 96-луночного планшета (Greiner, Германия) в 100 мкл среды XP Media (Molecular Devices, Великобритания), где клетки клона увеличивали свою численность под контролем прибора CloneSelect Imager (Molecular Devices, Великобритания). Клоны, достигшие уровня конfluence в 70% или более, переносили в 6-луночные планшеты (Greiner, Германия) в 3 мл среды OptiCHO с добавлением 8 мМ L-глутамин, 0,18% Pluronic-68 и инкубировали при 37°C при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере непрерывно в условиях инкубатора, где проверяется максимальная продукция каждого из них. Результаты обобщали и анализировали. Группу клонов в количестве 2–5 культур наиболее перспективных с точки зрения уровня продукции и ростовых характеристик подвергали селекции повышенными концентрациями селективных агентов МТХ и/или генетицина (в случае культуры S3). Выделенные клоны далее именуется по названию родительской культуры и их положению в 96-луночном планшете в момент отбора, например, S3-2A4.

3.14 Дополнительные этапы селекции

В случае культур-потомков культуры S3 на последнем этапе культивирования производили также увеличение концентрации селективного антибиотика G418 для увеличения количества копий гена тяжёлой цепи в геноме клеток линии. В случае культур-потомков культуры S11 этого не требовалось, так как в структуре векторов отсутствовали гены устойчивости к G418. Таким образом каждая из культур прошла через селективное давление 50, 500, 2000 нМ МТХ с последующим отбором клонов. Применялись методики, описанные в главах 3.6, 3.7, 3.8, 3.12, 3.13.

3.15 Проведение иммуноферментного анализа

Для проведения ИФА использовали 96-луночные планшеты Maxisorp (Nunc, Дания). Для сорбции антигена на подложку наносили очищенный рекомбинантный белок ФНО-а человека в количестве 100 мкл с концентрацией 10 мкг/мл в лунку и инкубировали при +4°C в течение ночи. Промывали 3 раза по 200 мкл ФБ с добавлением 0,5% Tween-20 и производили забивку 200 мкл на лунку ФБ с добавлением 0,5% БСА в течение 1 ч при 37°C. Наносили кондиционированную среду или очищенный препарат антител и титровали. Затем промывали 3 раза ФБ с добавлением 0,5% Tween-20 и наносили раствор вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена А8667 (Sigma-Aldrich, США), по 100 мкл в лунку (разводили в ФБ с добавлением 0,1% БСА в соотношении 1:20000). Инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C на орбитальном шейкере PST-60S1-4 (Biosan, Латвия) при постоянном перемешивании с частотой 300 об/мин. Лунки планшета промывали 3 раза 200 мкл ФБ с добавлением 0,5% Tween-20 и вносили однокомпонентный раствор ТМБ (Иммунотек, Россия) по 100 мкл в лунку, ожидали окраски в течение до 30 минут. Реакцию останавливали внесением 100 мкл 10% серной кислоты. Считывание показателей производили на планшетном спектрофотометре Model 680 (Bio-Rad,

США) при длине волны 450 нм. Результаты обобщали и производили расчёт концентрации антител в образцах.

3.16 Окраска клеток для проведения клеточной сортировки

Клетки линии S3 культивировали 3 дня и затем 3×10^7 клеток центрифугировали 5 минут при 900 об/мин. Далее дважды ресуспендировали 5 мл ФСБ и центрифугировали 5 минут при 900 об/мин. Клеточный осадок ресуспендировали в ФСБ и инкубировали с FITC-мечеными вторичными моноклональными антителами (Santa Cruz Biotechnology, США), узнающими константные домены антител. Инкубацию проводили в течение 1 ч при +4 °С. После проведения окраски центрифугировали клетки, ресуспендировали клетки пипетированием в 5 мл ФСБ, и центрифугировали 5 мин при 900 об/мин. Осажденную клеточную массу ресуспендировали в 10 мл ФСБ.

3.17 Получение и очистка белковых компонентов бессывороточной среды

Рекомбинантный трансферрин человека, полученный, как описано в [149], был предоставлен сотрудниками ИБХ РАН г.н.с., д.б.н. И.В. Смирновым и н.с, к.б.н. Т.В. Бобик.

Рекомбинантный инсулин человека, полученный, как описано в [150], был предоставлен рук. ОБП ИБХ РАН к.б.н. В.Н. Степаненко.

Рекомбинантный сывороточный альбумин человека (рЧСА), полученный, как описано в [149], был предоставлен сотрудниками ИБХ РАН г.н.с., д.б.н. И.В. Смирновым и н.с, к.б.н. Т.В. Бобик.

3.18 Получение небелковых компонентов бессывороточной среды

Селенит натрия (Sigma-Aldrich, Германия) растворяли в воде качества mQ в концентрации 1 мг/мл и стерилизовали через фильтр 0,22 мкм (Millipore, США).

3.19 Приготовление гидролизатов растительных белков и контроль реакции

Приготовление растворов (10-25 мг/мл) белков-субстратов (белковых порошков растений) проводили в 0,001 М ЭДТА•Na₂-буфере, рН 6,2, после экстракции в течение ночи при комнатной температуре. Белок, экстрагированный из порошков растений, отделяли центрифугированием при 9000 g на центрифуге 5810R (Eppendorf, Германия) в течение 40 мин. Содержание экстрагированного из порошка белка оценивали по его разнице до и после центрифугирования. В надосадочной жидкости белок, содержание которого определяли по методу Брэдфорд с использованием реактива Quick Start Bradford 1x Dye Reagent #5000205 (Bio-Rad, США), гидролизовали папаином. При этом в 1/20 часть не вносили папаин, а оставляли для контроля, который использовали на всех стадиях гидролиза. Гидролиз растительных белков осуществляли в 0,001 М ЭДТА•Na₂-буфере, рН 6,2, содержащем 0,005 М Cys, на качалке (150 об/мин) в течение 20 ч при 39 °С. Соотношение папаин: растительный белок составляло 1:20 (по количеству белка). Протеолитическую реакцию останавливали кипячением в течение 10 мин, реакционную смесь охлаждали до 7 °С. Содержание экстрагированных и прогидролизированных папаином растительных белков контролировали методом электрофореза в 12%-ном ПААГ (восстанавливающие условия) по методу Лэммли [151], отбирая аликвоты раствора, содержащие 30-50 мкг белка. Затем рН реакционной смеси доводили до 7,2, выпавший осадок снова удаляли центрифугированием (9000×g, 40 мин), а надосадочную жидкость пропускали через ячейку с мембраной Amicon PM-5 (Millipore, США), полученный раствор использовали. Количество полученных пептидов (с молекулярными массами менее 5 кДа, гидролизат) определяли по количеству прогидролизованного белка.

В качестве положительного контроля использовали 10%-ный гидролизат дрожжевой культуры, который растворяли в 100 мл воды качества mQ и автоклавировали для стерилизации в течение 40 мин при 121 °С. На всех этапах для анализа концентрации мАт в среде культивирования отбирали аликвоты

объёмом 200 мкл и центрифугировали при $450 \times g$ в течение 5 мин; концентрацию мАт определяли методом ИФА.

3.20 Клеточная культура и адаптация для роста в базовой среде

Для проведения экспериментов использовалась стабильная клеточная культура на основе линии CHO DG44 (Invitrogen, США), стабильно экспрессирующая растворимые рекомбинантные антитела в среду культивирования. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера объёмом 100 мл в 30 мл культуральной среды при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере S3.20L (ELMI, Латвия) с частотой 135 об/мин, при 37 °С и 95%-ной влажности. Была получена культура клеток, которая культивировалась на среде OptiCHO (Invitrogen, США) с добавлением 8 мМ L-глутамина. Адаптацию культуры для проведения экспериментов осуществляли ступенчато, переводя клетки в среду, основанную на среде Iscove's Modified Dulbecco Medium, (IMDM, Biolot, Россия), содержащую 8 мМ L-глутамина, 0,1% Pluronic F-68 и 1% ростовой добавки Insulin-transferrin-selenium (ITS, Gibco, США). Перевод клеток осуществляли постепенно, изменяя содержание среды с 50, 75, 90, 95 и до 100%. Окончанием этого процесса считали увеличение времени удвоения популяции клеток, равным 24 ч. При последующих изменениях состава питательной среды клеточную массу осаждали при $450 \times g$ в течение 5 мин и переводили на экспериментальную среду для исследования продуктивности.

3.21 Метод подпитки культуры CellBoost 7

Для приготовления растворов для подпитки культуры на ранних этапах использовали дрожжевой экстракт в концентрации 10%. Доводили по pH=7.4. Раствор стерилизовали автоклавированием. Раствор глюкозы 20% готовили с применением глюкозы Gibco (США), стерилизовали фильтрованием через мембрану 0,22 мкм (Millipore, США).

Для приготовления концентрата раствора питательных веществ для подпитки культуры прошедшей селекцию 2000 нМ МТХ на поздних стадиях культивирования для получения целевого белкового продукта клеточной линии использовали воду mQ (Millipore, США). Для приготовления концентрата Cell Boost 7a в объеме 500 мл применяли 90,54 г сухой смеси CellBoost 7a (HyClone, США). Доводили рН до 6.6–6.8 с помощью 10Н NaOH в 400 мл воды, после чего доводили до конечного объёма. Для приготовления концентрата Cell Boost 7b в объеме 50 мл применяли 4,73 г сухой смеси Cell Boost 7b (HyClone, США). Доводили рН до 11,0–11,4 с помощью 10Н NaOH в 40 мл воды, после чего доводили до конечного объёма. Стерилизовали фильтрованием через мембрану 0,22 мкм (Millipore, США). До применения все растворы хранили при температуре от +2 до +8 °С.

Подпитку культуры концентратом HyClone Cell Boost 7. Для этого вносили 1,5-3% Cell Boost 7a и 0,15–0,3% Cell Boost 7b в пропорции 10:1 для сохранения физиологического рН среды культивирования. В контрольную культуру клеток вносился равный внесённому объёму буфера ФСБ рН=7,4. Подкормку осуществляли 4 раза, начиная с четвёртого дня культивирования. Аликвоты для ИФА отбирали каждые два дня, осветляли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 минут и хранили при +4 °С.

3.22 Выделение и очистка препарата антител из культуральной среды

Выделение антитела против ФНО-а человека производили с помощью Protein A Agarose (Gibco BRL, США) на колонке. Использовали Wash (Binding) Buffer (50мМ Tris-HCl, рН=7,0), Elution Buffer (100 мМ Glycine, рН=3,0), Neutralization Buffer (1 М Tris-HCl, рН=9,). После нанесения 700 мкл Protein A Agarose на колонку, ее промывали 3 раза по 2 мл Wash Buffer. К образцу добавляли Binding Buffer в соотношении 1 часть буфера на 3 части супернатанта. Образец наносили при комнатной температуре с помощью перистальтического

насоса. После нанесения образца колонку промывали 3 раза по 20 мл Binding Buffer. Элюцию производили с помощью 6 фракций по 700 мкл Elution Buffer. После внесения каждой пробы к образцу добавляли по 30 мкл Neutralization Buffer для нейтрализации pH. Собирали 8 фракций элюата (E1-E8). Измерение выделенных антител в микрообъемах (1,5–2,0 мкл нанесения) проводили наноспектрофотометром Implen NanoPhotometer P-300 (Implen, Германия).

Очистку препарата производили методом гель-фильтрации на колонках HiLoad 26/600 Superdex 200 pg" (GE Healthcare Life Sciences, США). В ходе хроматографии использовали ФБР в качестве элюирующего.

3.23 Проведение электрофоретического анализа хроматографических фракций антител ФНО-а человека

Проводили в 10%-ном полиакриламидном геле. В качестве контроля использовали Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas, Литва). Перед внесением к 10 мкл образца добавляли 5 мкл буфера для нанесения с 2-меркаптоэтанолом (2-ME). В случае проведения анализа выделения препарата антител из кондиционированной среды, ставили контроль в виде концентрированной по Фольи среды и отмывочного буфера (PBS) для уверенности в полном связывании белка на колонке с носителем, а также полного смывания белка с носителя. Антитела наносили на гель в буфере для нанесения, содержащем 2-ME и не содержащем его.

3.24 Определение концентрации ДНК и антител

Концентрацию плазмидной ДНК определяли с применением Implen Nanophotometer P300 (Германия) в аликвотах равных 2 мкл раствора.

Концентрацию антител определяли с применением Implen Nanophotometer P300 (Германия), а также по методу Бредфорд с использованием Bio-Rad Protein Assay (Германия) в 96-луночных планшетах Greiner (Германия). Измерения

оптической плотности производили на планшетном спектрофотометре Model 680 (Bio-Rad, США) при длине волны 595 нм.

4 Результаты

4.1 Получение экспрессионных плазмид и их линейаризация

В векторы pcDNA3.3 и pOptiVEC (Invitrogen, США) с помощью синтетического олигонуклеотидного дуплекса были введены сайты узнавания рестриктаз NheI (Fermentas, Литва) и XhoI (Fermentas, Литва) и отобраны клоны с правильной ориентацией дуплекса. Ранее из библиотеки кДНК, полученной на основе мРНК гибридомы, продуцирующей антитела к ФНО-а человека, были выделены и охарактеризованы клоны, содержащие гены переменных областей тяжелой и легкой цепей антитела к ФНО-а человека [5].

Кодирующая последовательность химерной легкой цепи антитела была получена в результате объединения мышиного переменного и человеческого константного доменов методом SOE-PCR. Амплификация проводилась со специфическими олигонуклеотидными праймерами, с помощью которых на 5'-конец гена был введен сайт узнавания рестриктазы NheI, а на 3'-конец был введен сайт XhoI. После обработки PCR-фрагмента соответствующими рестриктазами кодирующую последовательность химерной легкой цепи антитела клонировали в векторы pcDNA3.3 и pOptiVEC с введенными сайтами узнавания рестриктаз NheI и XhoI, и секвенировали по двум цепям по методу Сэнгера.

Для получения фрагмента ДНК, кодирующего химерную тяжелую цепь, с помощью PCR на 5'- и 3'-конец гена переменной области тяжелой цепи антитела были введены сайты узнавания рестриктаз NheI и ApaI, соответственно. На 3'-конец гена константной области тяжелой цепи антитела был введен сайт узнавания рестриктазы XhoI. Сайт рестриктазы ApaI является эндогенным сайтом рестрикции на 5'-конце константного C_H1-домена человека. После обработки соответствующими рестриктазами переменный и константный домены совместно клонировали по сайтам узнавания рестриктаз NheI и XhoI в векторы

pcDNA3.3 и pOptiVEC и проводили секвенирование по двум цепям по методу Сэнгера.

Для получения фрагмента ДНК, кодирующего гены флуоресцентных белков EGFP и mCherry, с помощью PCR на 5'-конец генов были введены сайты узнавания рестриктаз NheI. На 3'-конец генов был введен сайт узнавания рестриктазы XhoI. После обработки соответствующими рестриктазами гены флуоресцентных белков клонировали по сайтам узнавания рестриктаз NheI и XhoI в векторы pOptiVEC и pcDNA3.3, соответственно, и проводили секвенирование по методу Сэнгера.

Схема получения генетических конструкций, содержащих гены цепей рекомбинантных антител на примере гена тяжёлой цепи антитела против ФНО-а человека или генов флуоресцентных белков представлены на **Рисунке 1**.

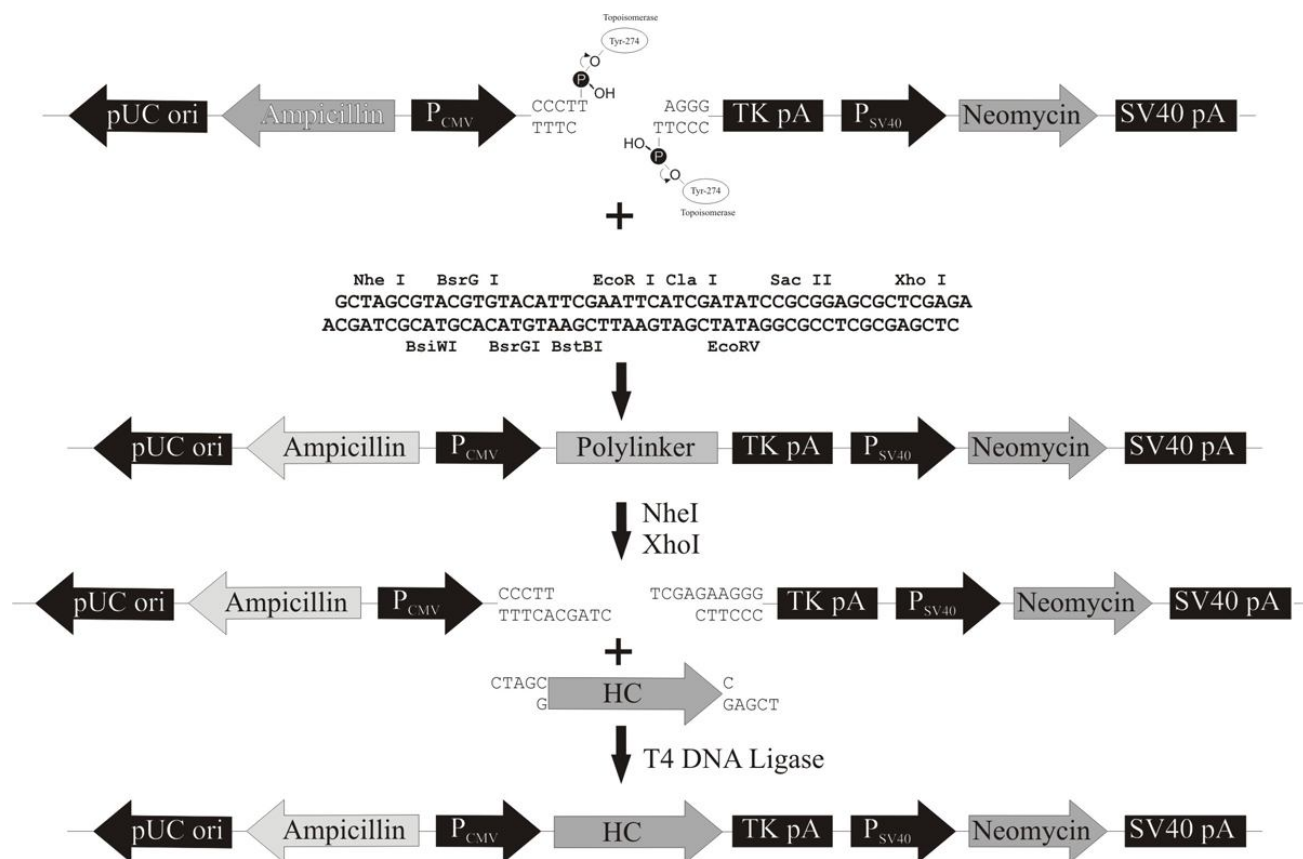


Рисунок 1. Схема получения генетических конструкций, содержащих гены цепей рекомбинантных антител на примере гена тяжёлой цепи антитела против ФНО-а человека

Таким образом, были получены следующие экспрессионные конструкции:

- экспрессионные плазмиды pOptiVEC-EGFP и pcDNA3.3-mCherry, содержащие ген зеленого флуоресцентного белка для контроля процессов трансфекции и селекции;
- плазмиды, содержащие гены тяжелой и легкой цепей антител, а именно, pcDNA3.3-LC, pcDNA3.3-HC, pOptiVEC-HC, pOptiVEC-LC содержащие гены тяжелой и легкой цепей химерного антитела F10 против ФНО-а человека. Указанные плазмиды содержат следующие регуляторные элементы, а также компоненты генов полноразмерных антител:
- фрагмент ДНК, кодирующего 5'-нетранслируемую область и содержащего последовательность Козак;

- последовательности лидерных пептидов, обеспечивающих секрецию иммуноглобулинов;
- константный домен легкой цепи иммуноглобулина человека каппа-подкласса;
- фрагмент ДНК, кодирующего 3'-нетранслируемую область и содержащего сайт полиаденилирования;
- константные домены C_H1- C_H3 тяжелой цепи человека IgG1-подкласса.

Следующей задачей являлось получение пары бипромоторных экспрессионных плазмид, в которых ген легкой цепи антитела транскрибировался с CMV промотора, а ген тяжелой цепи антитела - с промотора EF-1 α (**Рисунок 2**). Данные плазмиды различались ориентацией направления генов. Также отличием данной плазмиды являлось то, что гены обеих цепей антитела находились в одной плазмиде.

Для этого конструировали кассеты тяжёлой цепи антитела и регуляторных элементов (**Рисунок 2**), для создания бипромоторных векторов подвергали рестрикции по MluI-сайту плазмиду OptiVEC-LC, дефосфорилировали и лигировали по MluI-сайту с фрагментами ДНК, ранее объединенными с EF-1 промотором и сайтом полиаденилирования BGH и отбирали плазмиды с разной ориентацией вставки (прямая - «голова-хвост» или обратная - «голова-голова») (**Рисунок 3Г, Д**).

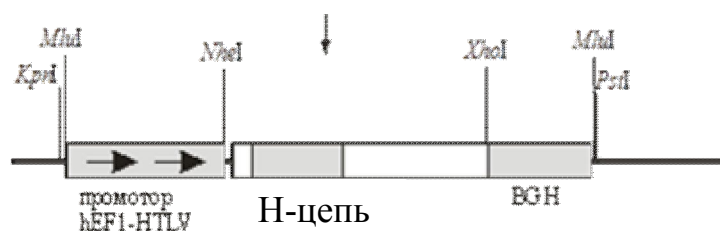


Рисунок 2. Кассета с тяжелыми цепями антител и второй парой промотора и сайта полиаденилирования для создания бипромоторных векторов

В результате были получены векторные конструкции, несущие в одной последовательности гены лёгкой и тяжёлой цепей антитела одновременно (Рисунок 3Г, Д).



Рисунок 3. Схема структуры плазмид для биплазмидной и бипромоторной экспрессии, плазмид с генами флуоресцентных белков

А — Плазмиды pOptiVEC-LC и pcDNA3.3-HC, несущие лёгкую цепь антитела и ген дигидрофолатредуктазы, а также тяжёлую цепь и ген устойчивости к генетицину, соответственно;

Б - Плазмиды pOptiVEC-HC и pcDNA3.3-LC, несущие тяжёлую цепь антитела и ген дигидрофолатредуктазы, а также лёгкую цепь и ген устойчивости к генетицину, соответственно;

В — Плазмиды pOptiVEC-EGFP и pcDNA3.3-mCherry, несущие ген белка EGFP и ген дигидрофолатредуктазы и ген белка mCherry под и ген устойчивости к генетицину, соответственно;

Г - Плазида pViPr-ABTNF, несущая гены тяжёлой и лёгкой цепей антитела против ФНО-а человека и ген дигидрофолатредуктазы в прямой ориентации «голова-хвост»;

Д - Плазида pViPr-ABTNF, несущая гены тяжёлой и лёгкой цепей антитела против ФНО-а человека и ген дигидрофолатредуктазы в обратной ориентации «голова-голова».

pUC ori – участок, отвечающий за репликацию плазмиды; Amp – ген устойчивости к ампициллину; P_{CMV} – сильный промотор цитомегаловируса; EF-1 α – эукариотический фактор элонгации; BGHT – терминатор бычьего гормона роста; LC – лёгкая цепь антитела; HC – тяжёлая цепь антитела; EGFP – ген усиленного; mCherry – ген белка из семейства красных флуоресцентных белков mFruits; IRES – участок внутренней посадки рибосомы; DHFR – ген белка дигидрофолатредуктазы; P_{SV40} – промотор полиомавируса; Neo – ген 3'-гликозил фосфотрансферазы; TKrA – терминатор тимидинкиназы, содержащий сигнал полиаденилирования.

Линеаризацию векторов для получения стабильных клеточных линий проводили по описанной выше методике и полноту её оценивали электрофоретически (**Рисунок 4**).

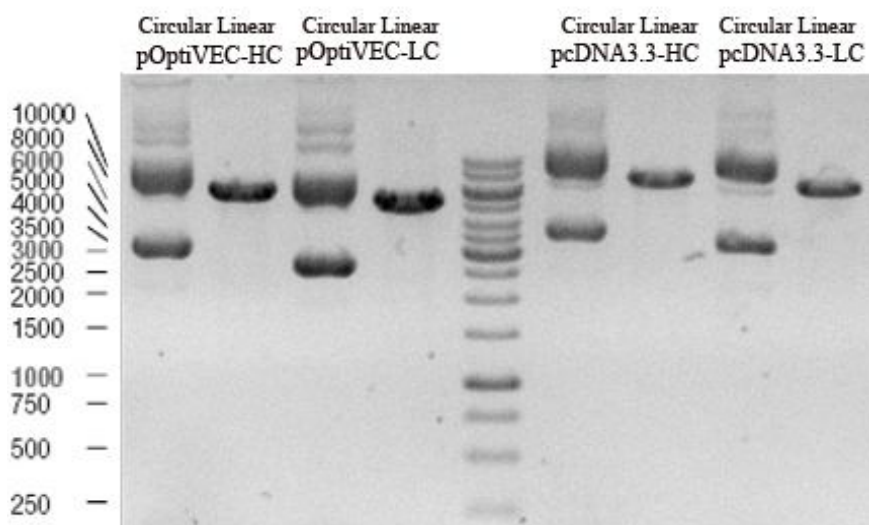


Рисунок 4. Электорофореграмма плазмид pOptiVEC-HC, pOptiVEC-LC, pcDNA 3.3-HC, pcDNA 3.3-LC и тех же плазмид, линейаризованных с помощью рестриктазы P_{le19I} по уникальному сайту CGAT↑CG в гене устойчивости к ампициллину

4.2 *Определение эффективности трансфекции*

Эффективность трансфекции векторами pcDNA 3.3-EGFP и pOptiVEC-Cherry представлена ниже (**Рисунок 5**). Проверка уровня трансфекции культуры клеток для каждой плазмиды и пары плазмид производилась с целью выявления доли двойных трансфектантов в культуре клеток перед началом селекции культуры, переводением на селективную среду культивирования. Достижение высокого уровня двойной трансфекции культуры позволяет ускорить процедуру селекции и сократить время, необходимое для получения стабильной клеточной линии (**Рисунок 5**).

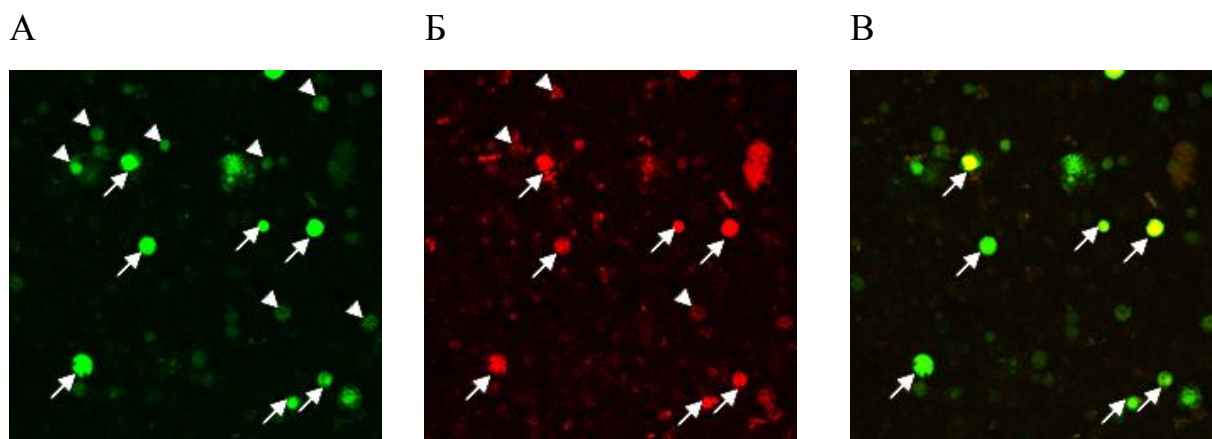


Рисунок 5. Флуоресценция клеток при различных длинах волн

Клетки CHO DG44, были трансфицированы парой плазмид, содержащими гены флуоресцентных белков EGFP и mCherry. Показана флуоресценция при различных длинах волн. А- 488 нм; Б- 561 нм; В- наложение 488 и 561 нм.

Уровень трансфекции клеток культуры для вектора pcDNA 3.3-EGFP составил 43%, для pOptiVEC-Cherry — 46%. Уровень двойной трансфекции одновременно парой обозначенных векторов был равен 16,4% от общего числа клеток. Таким образом, было выяснено, что получаемый уровень двойных трансфектантов достаточен для проведения последовательной селекции полученной культуры-продуцента.

4.3 Сравнение культур на основе биплазмидной экспрессии

Получение стабильной клеточной линии, производящей химерные антитела против ФНО-а, было осуществлено с использованием метода амплификации числа копий генов в дигидрофолат/метотрексатной системе [152]. Плазмиды pOptiVEC-L, pOptiVEC-H, pcDNA3.3-L и pcDNA3.3-H, содержащие гены легкой и тяжелой цепей химерного антитела к ФНО-а, были использованы для трансфекции суспензионной клеточной линии DG44 (*dhfr*^{-/-}), производной линии CHO, не способной продуцировать дигидрофолатредуктазу. Для выяснения наиболее оптимального способа получения стабильной клеточной линии были

использованы две комбинации плазмид, в результате чего были получены клеточные линии S1 и S3 (Таблица 2).

Использование метода рестрикции по сайту узнавания эндонуклеазы рестрикции P_{le}19I (PvuI) позволяет получить линейаризованные плазмидные конструкции, которые обладают измененными свойствами по сравнению с кольцевой и суперскрученной формой. В данном случае при трансфекции линий клеток линейаризованной формой плазмиды, частота трансфекции снижается. Однако, линейаризованные плазмиды интегрируются в геном с гораздо большей частотой. По некоторым данным, частота интеграции возрастает с 10^{-6} до 10^{-4} случаев интеграции в трансфицированной культуре. Также, применение линейаризованных плазмид позволяет им встраиваться в геном клетки-хозяина без повторного встраивания в последовательность целевого гена или других элементов, необходимых для экспрессии в клетках млекопитающих. Этого удалось добиться, т.к. ген устойчивости к ампициллину был рестрицирован эндонуклеазой P_{le}19I. При интеграции в геном клетки-хозяина целостность гена может восстановиться при условии встраивания линейаризованных плазмид по схеме голова-хвост, однако последующие этапы селекции в виде клеточной сортировки позволяют исключить такие клетки из популяции и добиться повышения продукции культуры в целом.

После трансфекции при экспрессии рекомбинантных антител в среду культивирования обе культуры показывали примерно равный уровень продукции, колеблющийся в пределах 1,5–2 мкг/мл культуральной среды, определенный методом ИФА. Далее, для каждой из культур была проведена селекция с применением методики, основанной на смене среды и добавления селективного агента G418, получивших вектор pсDNA3.3. После этого была проведена селекция с использованием MTX для обеих культур.

Таблица 2. Стабильные клеточные линии для получения химерного антитела к ФНО-а

Клеточная линия	Вектор, содержащий легкую цепь	Вектор, содержащий тяжелую цепь
S1	pcDNA3.3	pOptiVEC
S3	pOptiVEC	pcDNA3.3

Селекцию клеток проводили с помощью селективных агентов, гены устойчивости к которым имеются в плазмидных конструкциях. В результате анализа уровня продукции антител в линиях S1 и S3 на различных этапах селекции МТХ был сделан выбор в пользу дальнейшего использования линии S3. Из сравнения приведенных данных следует, что продуктивность линии S3 превышает уровень продукции антител в линии S1 (**Рисунок 6**).

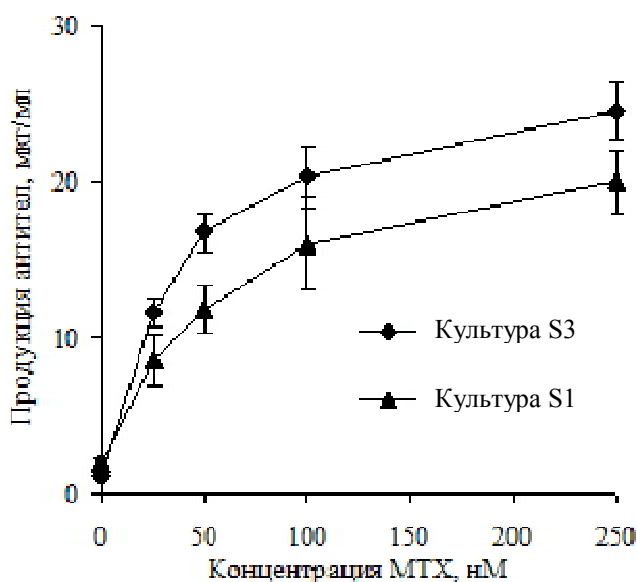


Рисунок 6. Продукция антител в клеточных линиях S1 и S3 в зависимости от концентрации метотрексата в среде культивирования

Значения приведены для культивирований, выполненных в конце каждого из последовательных циклов селекции.

В рамках оптимизации лабораторной технологии культивирования клеточных линий в суспензии было исследовано влияние плотности клеточного инокулята и режима культивирования на уровень продукции антител. Антитело-продуцирующую линию S3-250nM выращивали в присутствии 250 нМ МТХ и 500 мкг/мл G418 в качестве селектирующих агентов. С целью выяснения оптимального метода культивирования в суспензии были использованы три основных подхода.

В методе произвольного культивирования с низкой плотностью посева клетки вносили в среду культивирования в минимальной необходимой концентрации 3×10^5 клеток/мл. Культивирование проводили без замены культуральной среды, при этом клетки росли без какого-либо вмешательства. Аликвоты отбирали каждые 48 ч. Концентрацию антител оценивали по результатам ИФА (**Рисунок 7**). При плотности культуры 3×10^6 клеток/мл рост прекращается, и в дальнейшем плотность начинает снижаться. Это приводит к прекращению биосинтеза антител, в результате чего концентрация антител в среде остается на одном уровне.

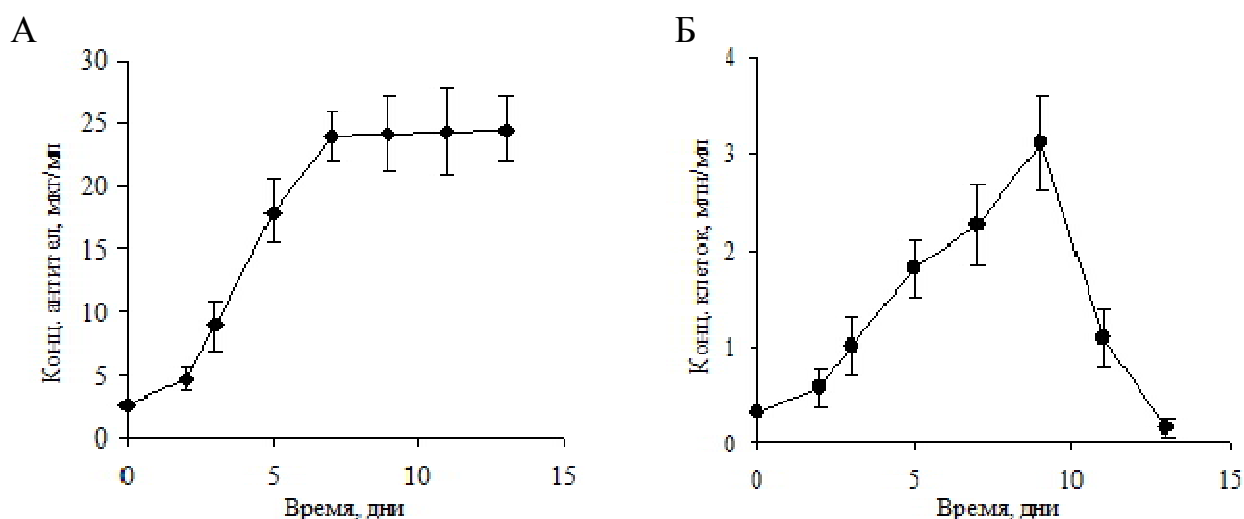


Рисунок 7. Уровень продукции антител (А) и количество живых клеток в культуре (Б) при произвольном культивировании клеток линии S3-250нМ

Принцип метода контролируемой плотности заключался в поддержании концентрации клеток в пределах, не допускающих контактного торможения культуры. Клетки вносили в культуральную среду в концентрации 6×10^5 клеток/мл. Клетки центрифугировались каждые 48 ч, после чего их вносили в ту же среду. Количество клеток поддерживалось в концентрации 6×10^5 клеток/мл. Данный подход позволял клеткам свободно делиться и поддерживать высокий уровень пролиферативной активности (**Рисунок 8**).

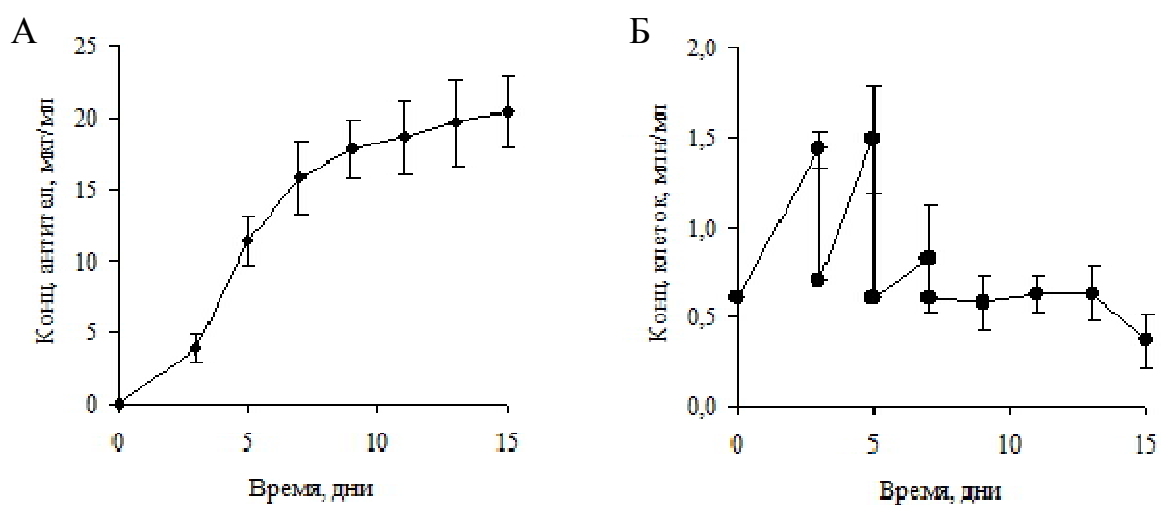


Рисунок 8. Уровень продукции антител (А) и количество живых клеток (Б) при контролируемом уровне плотности культуры

Метод сверхплотной инокуляции заключался в использовании высокой плотности инокулирования 4.5×10^6 клеток/мл. Культивирование производилось без замены питательной среды. В результате такого культивирования количество живых клеток в культуре постепенно снижалось, при этом продукция антител сохранялась на уровне культуры, выращиваемой методом контролируемой плотности, и была даже ниже, чем в культуре с произвольным культивированием (**Рисунок 9**).

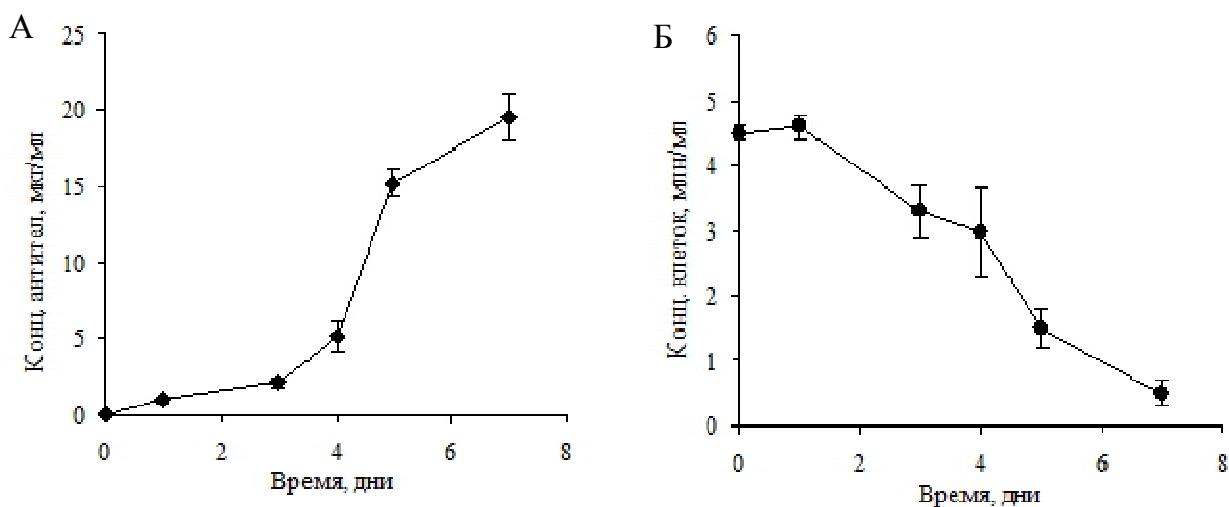


Рисунок 9. Уровень продукции антител (А) и количество живых клеток (Б) в культуре при высокой плотности инокулирования

Использование данного режима приводило к постепенному уменьшению плотности культуры и прекращению биосинтеза антител.

Наибольшие уровни экспрессии, которые наблюдали при использовании описанных методов культивирования, приведены в **Таблице 3**.

Таблица 3. Уровень продукции антител при различных методах культивирования в суспензии.

Метод культивирования	Концентрация антител в культуральной среде, мкг/мл
Метод произвольного культивирования	24,5 ± 3
Метод контролируемой плотности	20,4 ± 2,5
Метод сверхплотной инокуляции	19,5 ± 1,5

Метод произвольного культивирования с низкой плотностью посева при произвольном культивировании позволил добиться наибольшего выхода биосинтеза антител.

Была также исследована возможность культивирования клеток стабильной клеточной линии в биосовместимых полупроницаемых полиэлектролитных микрокапсулах, а также изучена кинетика накопления антител в культуральной среде. Микрокапсулирование клеточной линии СНО S3 осуществляли путем приготовления 1,5 мл микрокапсул и 1,5 мл гранул на 30 мл среды, что соответствовало плотности 3×10^5 клеток/мл культуральной среды. В качестве контроля использовали суспензионную культуру СНО S3.

Сравнение уровня экспрессии антител в микрокапсулах, микрогранулах и в суспензии производили в ходе выращивания в течение 18 дней (**Рисунок 10**).

Из **Рисунка 10А** можно сделать вывод о том, что культивирование стабильных антитело-продуцирующих линий в микрокапсулах приводило к увеличению продукции белка по сравнению с суспензионной культурой. В то время, как кривая накопления антител в суспензионной культуре выходила на плато уже на 7 день культивирования при достижении максимально допустимой в суспензионной культуре концентрации клеток (порядка $4-5 \times 10^6$ /мл среды), клетки в микрокапсулах продолжали пролиферировать и продуцировать антитела. При этом количество антител, накапливающихся в среде культивирования, увеличивалось на протяжении всего эксперимента и достигало 55 мкг/мл на 18 день, что достоверно выше, чем в суспензионной культуре. В случае микрогранул также наблюдали постепенное накопление антител в среде, однако в меньших количествах, чем в случае культивирования клеток в микрокапсулах. Это можно объяснить наличием гелевой структуры микрогранул, которая ограничивала свободное деление клеток (**Рисунок 10Б**).

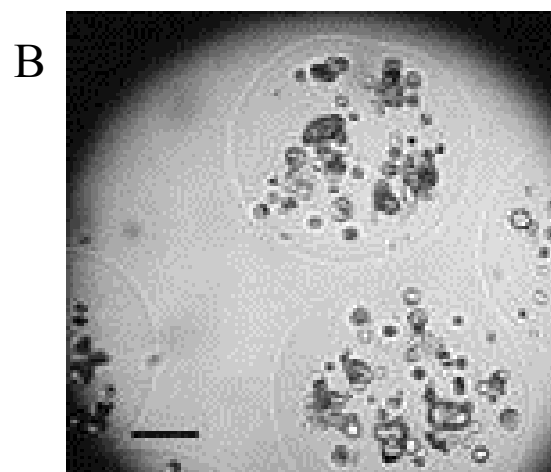
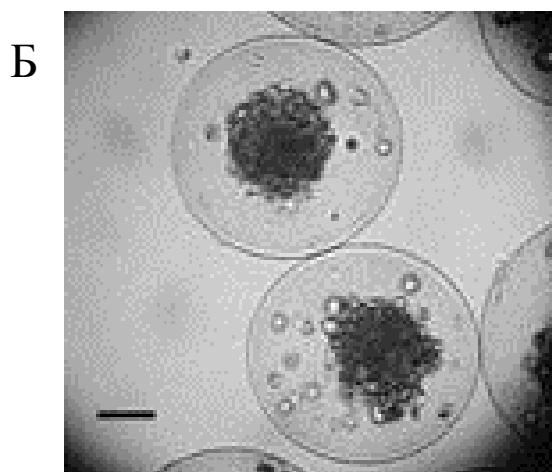
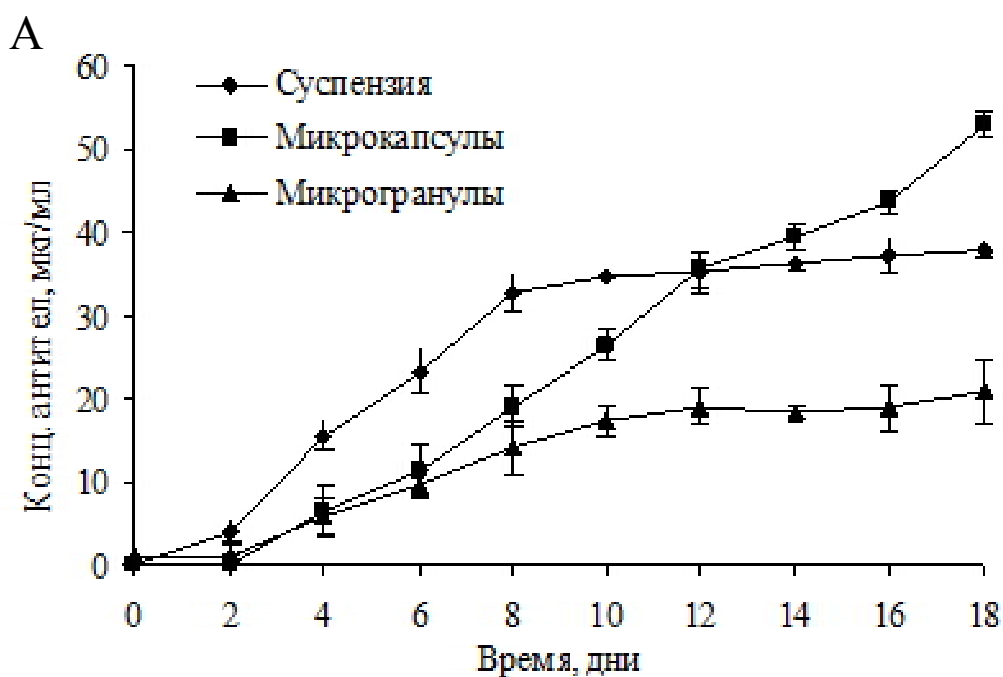


Рисунок 10. Культивирование СНО S3 в микрокапсулах, микрогранулах и суспензионной культуре:

(А) продукция антител; (Б) изображения клеток на 14 день культивирования, растущих в CaAlg микрогранулах; (В) — в альгинат-олигохитозановых микрокапсулах. Шкала 100 мкм.

При этом клетки могли расти и пролиферировать только внутри каналов гидрогеля, в то время как в микрокапсуле свободного объема для роста клеток было значительно больше (**Рисунок 10В**).

4.4 Цитосортировка

С целью отбора клеточной популяции, характеризующейся повышенным уровнем экспрессии антител к стабильной линии CHO S3-500nM, полученной с помощью метотрексатной (500 нМ) и G418 (500 мкг/мл) селекции, был применен метод флуоресцентной клеточной сортировки на проточном цитофлуориметре с последующим культивированием. До этой процедуры для линии S3 MFI (средняя интенсивность флуоресценции) (которая косвенно указывает на экспрессию целевого белка) составлял 15,2, а продуктивность 64 мг/л.

Результаты клеточной сортировки представлены на **Рисунке 11**. Линия S3, не инкубированная в присутствии вторичных антител, использована в качестве контроля (**Рисунок 12**).

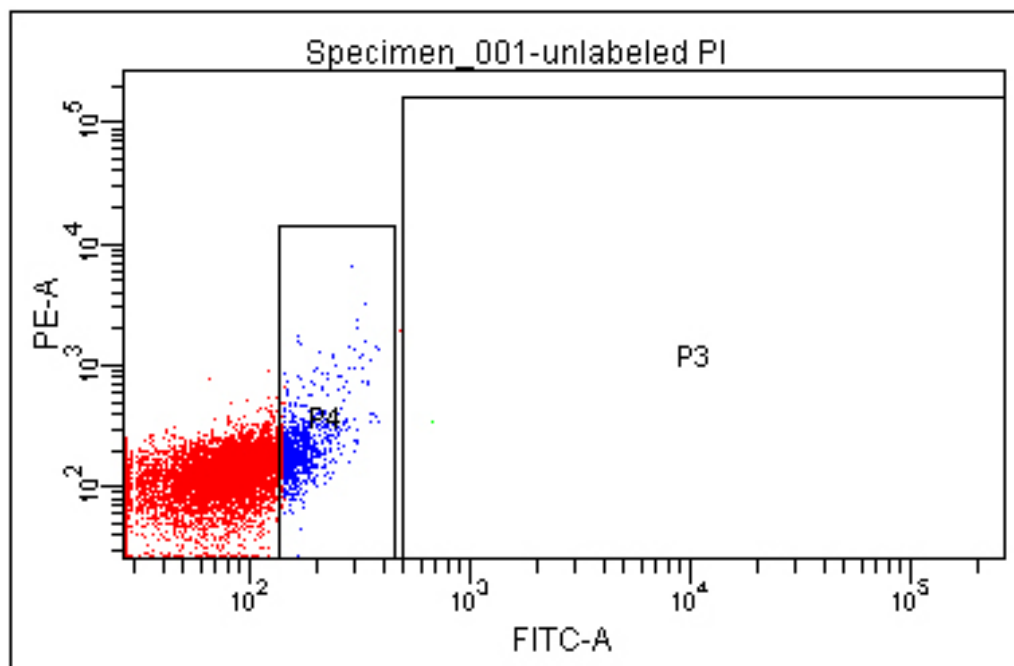


Рисунок 11. Контрольные клетки линии S3

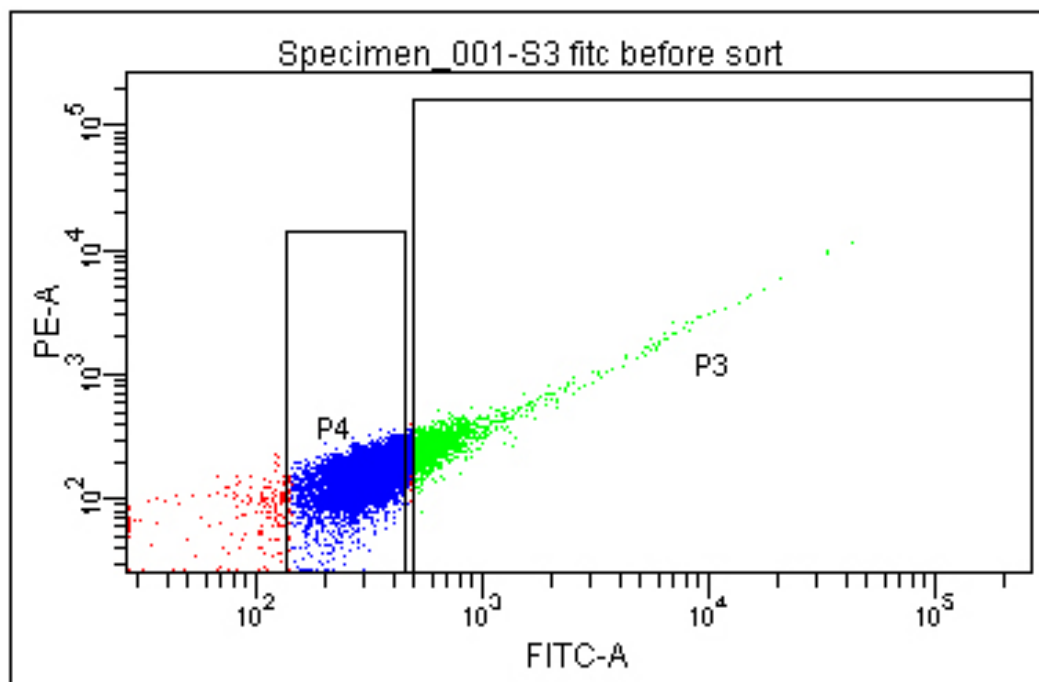


Рисунок 12. Помеченные клетки линии S3

Клетки были помечены с помощью вторичных антител к иммуноглобулинам человека с флуоресцентным красителем FITC и были отсортированы в различные пробирки по квадрантам P3 и P4. В квадранте P3 находится 13% FITC-положительных клеток. В квадранте P4 находятся FITC-негативные клетки.

Культура FITC-положительных клеток была названа S3c2. После сортировки положительные и негативные клетки были анализированы с помощью проточной цитометрии (**Рисунок 13, Рисунок 14**).

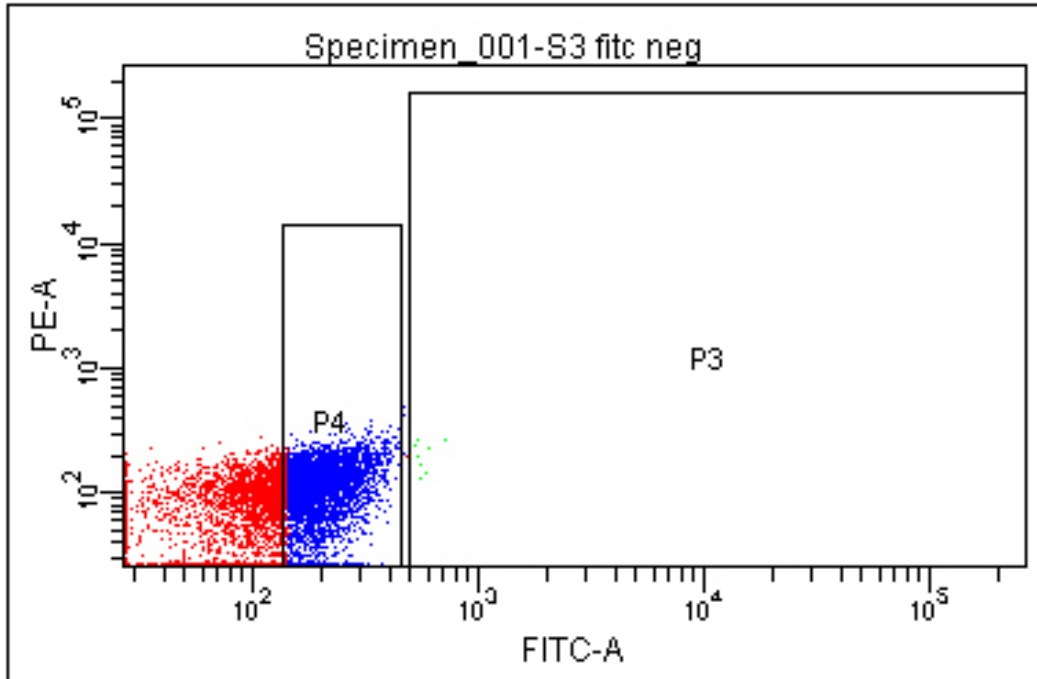


Рисунок 13. Негативные клетки после проведения сортировки

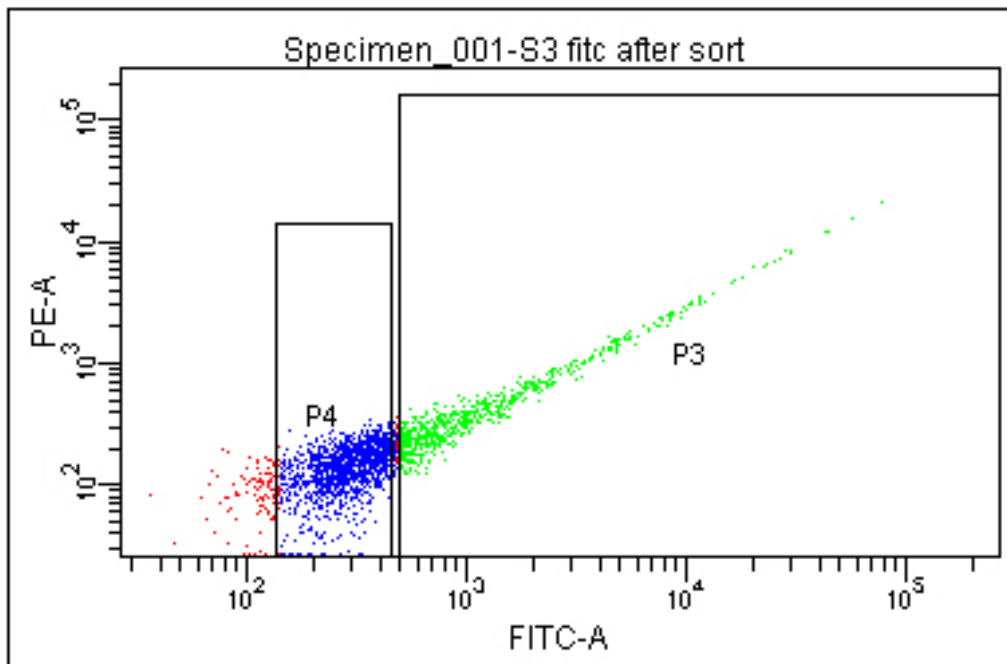


Рисунок 14. Позитивные клетки после проведения сортировки

После культивирования исходных и сортированных клеток в бессывороточной среде OptiCHO были взяты аликвоты среды и анализированы

методом ИФА. В качестве контроля использовались выделенные и диализованные в ФСБ антитела против ФНО-а (**Рисунок 15Б**).

Известно, что клетки, стабильно продуцирующие антитела в среду культивирования могут экспонировать их на своей поверхности. Для проверки предположения о том, что данная популяция является более продуктивной относительно остальных клеток популяции, была проведена цитосортировка (**Рисунок 15А**). Часть клеточной популяции для каждой из линий содержала на своей поверхности повышенное количество экспонированных антител, детектированных с применением вторичных антител при инкубации. Каждая из культур клеток была окрашена и отсортирована. Для каждой их культур клеток линий S3 и S1 были взяты 2×10^7 клеток соответствующей линии. Границы квадранта P4 выставлялись по границе контрольной группы клеток, не содержащих целевых вставок в виде экспрессионных плазмид и не продуцирующих антитела в среду культивирования, и не экспонирующих их на своей поверхности. Квадрант P3 для контрольной группы не содержал клеток, для линий S3 и S1 содержал до 17% клеток от общего числа анализированных клеток.

Оказалось, что и до, и после сортировки культуры S3 выражены более высокие уровни IgG человека, средняя интенсивность флуоресценции (MFI) составляла 3,7 и 15,2, соответственно, чем культуры S1 (2,8 и 9,2) (**Рисунок 15В, Г**). Сортировка клеток S3 привела к увеличению производства антител на 30%, а производство антител культурой S1 не изменилась значительно (**Рисунок 15Б**).

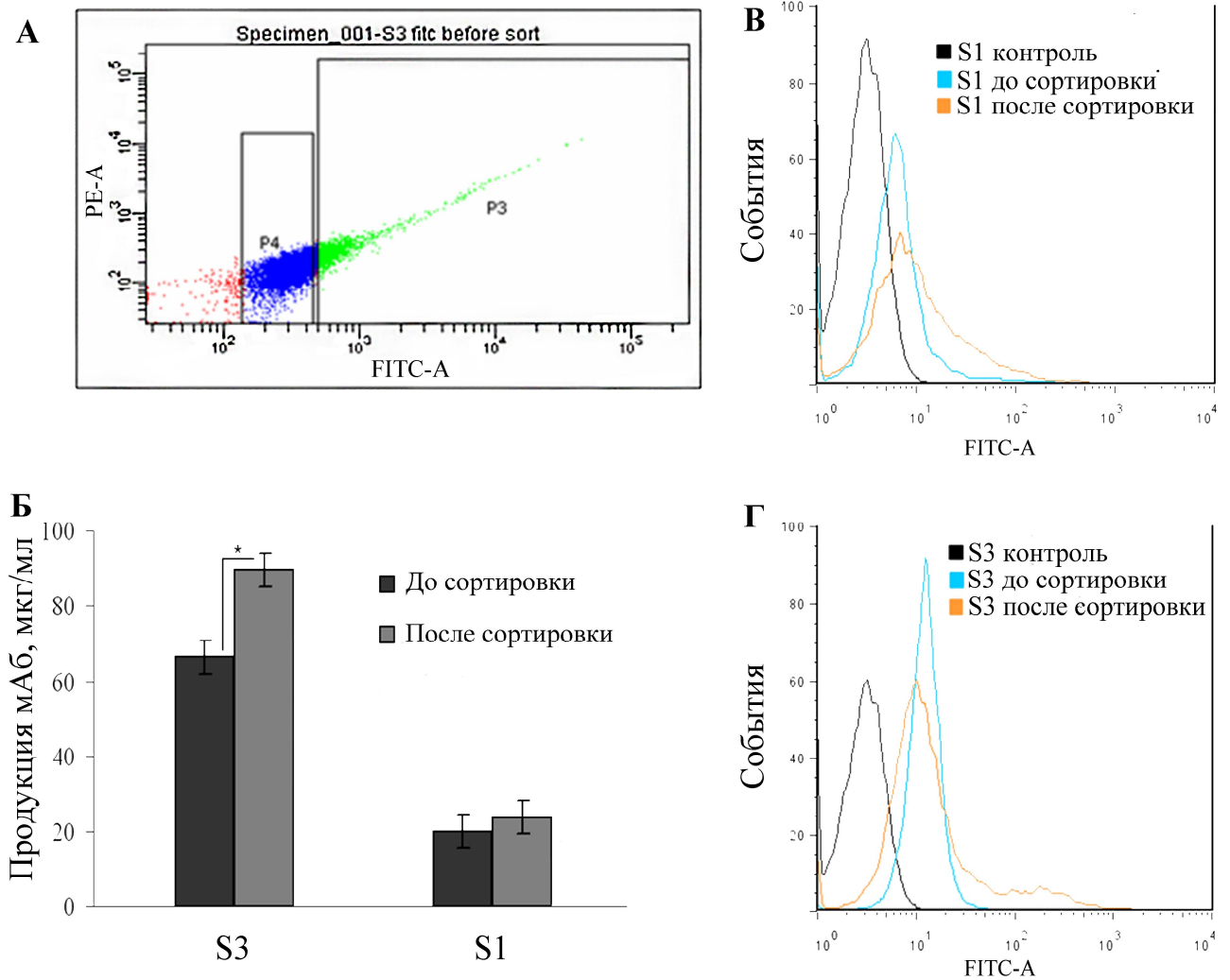


Рисунок 15. Оптимизация продукции антител на проточном цитосортировщике

А. Помеченные клетки линии S3 до сортировки.

Клетки были помечены с помощью вторичных антител к иммуноглобулинам человека с флуоресцентным красителем FITC и были отсортированы в различные пробирки по квадрантам P3 и P4. В квадранте P3 находится 17% FITC-положительных клеток. В квадранте P4 находятся FITC-негативные клетки.

Б. Изменение максимальной продукции антител линии S1 и S3 в ходе цитосортировки и проведения при культивировании с 1000 нМ МТХ.

В, Г. Цитосортировка культур S1 и S3 соответственно

Изменение содержания FITC-положительных клеток в культуре до и после проведения цитосортировки. В. культуры S1; Г — культуры S3. Сдвиг кривой на

гистограмме говорит об увеличении соотношения FITC-окрашенных клеток относительно общей массы клеток, взятых для сортировки, а также увеличение доли яркосветящихся клеток

Выделенные негативно окрашенные популяции клеток показали уровень продукции более низкий, чем родительская культура, для каждой из стабильных клеточных культур S3 и S1 (данные не приведены). Данное обстоятельство показывает, что уровень поверхностной экспозиции IgG пропорционален уровню продукции культуры клеток в среде культивирования.

Для понимания причин отсутствия значимого увеличения продукции рекомбинантных антител культурой клеток S1, при повторном проведении сортировки необходимо рассмотреть динамику роста, жизнеспособность культур S3 и S1. Данные параметры идентичны для обеих культур. При проведении эксперимента по сортировке жизнеспособность составляла 95% и более, а скорость удвоения была равна между культурами. Различия двух линий касались только уровня продукции. Продуктивность линии S3 была достоверно выше (**Рисунок 15Б**). Таким образом, мы пришли к выводу, что снижение производства рекомбинантных антител в культуре S1 было продиктовано её внутренними свойствами и не было связано с гибелью клеток.

4.5 Внутриклеточная экспрессия лёгкой и тяжёлой цепей антитела в культурах S1 и S3

Для понимания разницы между полученными стабильными культурами S3 и S1 нами были проведены исследования накопления полипептидов лёгкой и тяжёлой цепей антитела. Для этого были взяты культуры S3 и S1 после прохождения сортировки. Обе культуры были осаждены, отмыты ФСБ, пермеабелизованы и окрашены мечеными FITC вторичными антителами к каппа-цепи и Fc-фрагменту по описанной методике. Было выяснено, что клетки

культуры S1 производят в 5,6 раза меньше полипептида тяжёлой цепи антитела, чем клетки культуры S3. Соотношение составило 9,5% для культуры S1 против 53,4% для культуры S3 (**Рисунок 16А, Б**).

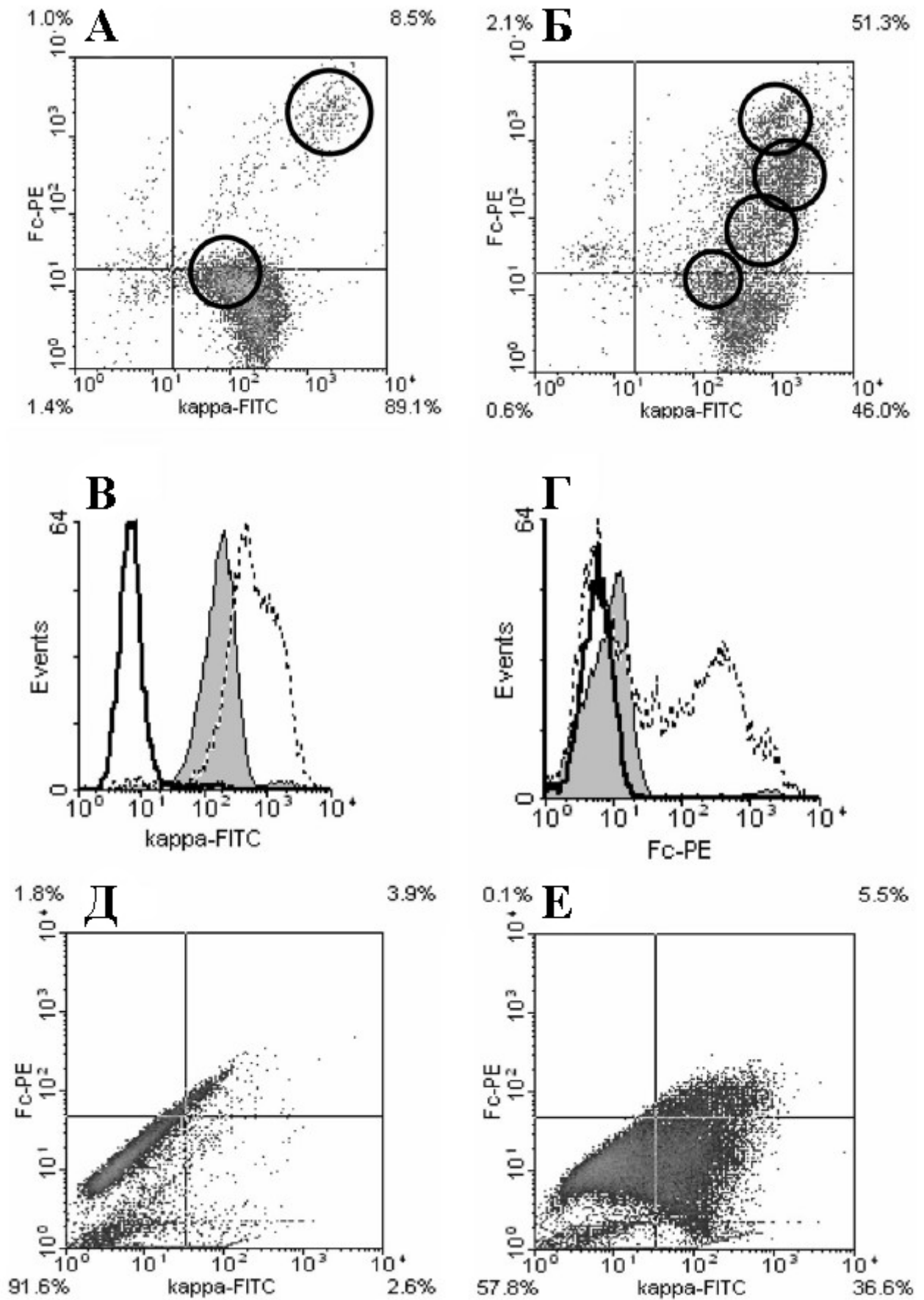


Рисунок 16. Накопление тяжелых и легких цепей в культурах S1 и S3 после селекции МТХ

А, Б Дотплоты, показывающие внутриклеточное накопление легких и тяжелых цепей человеческого IgG в S1 (А) и S3 (Б) в пермеабелизованных клетках СНО.

В, Г Наложение гистограмм уровня экспрессии для лёгкой (каппа-FITC, В) и тяжелой (Fc-PE, Г) цепей в S1 (сплошная серая) и S3 (пунктирная линия) по сравнению с контролем вторичного антитела (пустой профиль гистограммы). Д, Е экспрессия тяжелых и легких цепей антител, ее на поверхности живых клеток культур СНО S1 (Д) и S3 (Е).

Жизнеспособность и клеточная плотность для культур S1 и S3 представлены на **Рисунке 18А, В**. Почти все тяжёлые цепи антитела находятся в связанном виде с лёгкими цепями. Это справедливо для 96% случаев. Таким образом, можно предположить, что наличие тяжёлой цепи является лимитирующим параметром при продукции антител культурой клеток. Также нами было продемонстрировано, что около 99% клеток производят лёгкую цепь рекомбинантного антитела (**Рисунок 16А, Б**), однако содержание лёгкой цепи антитела в культуре S3 значительно выше такового для S1 культуры (**Рисунок 16В, Г**, MFI 1020 и 150, соответственно). Также нами было установлено, что культура S3 содержит 4 различных популяции клеток, продуцирующих высокое (6% MFI 2150), среднее (21%, MFI 430), низкое (16%, MFI 75) и очень низкое (16% MFI 15) число копий полипептида тяжёлой цепи (**Рисунок 16А, Б**, круги). Мы предполагаем, что это соответствует числу копий гена в клетке. Противоположная ситуация складывается для культуры S1, где можно выделить лишь две субпопуляции с высоким (2%, MFI 2320) и низким (42% MFI 13) (**Рисунок 16А**, круги) числом копий тяжёлой цепи. Можно сделать вывод, что клетки культуры S1 препятствуют накоплению генов тяжёлой цепи антитела посредством мультпликации, если ген тяжёлой цепи находится под контролем селективного маркера *dhfr*. Также нами была проведена проверка экспрессии и

экспонирования лёгкой и тяжёлой цепей антитела для обеих культур клеток в живом состоянии. Было выявлено, что лёгкая цепь отдельно экспонируется только на поверхности клеток культуры S3, напротив клетки культуры S1, практически не экспонируют её (**Рисунок 16Д, Е**). Тяжёлая цепь на поверхности клеток представлена в минимальных количествах и её количество одинаково для обеих культур клеток.

4.6 Разные комбинации экспрессионных плазмид

Культуры S1 (HL) (**Рисунок 17А**) и S3 (LH) (**Рисунок 17Б**), прошедшие двойную трансфекцию были поэтапно селектированы с получением стабильных линий клеток, устойчивых к 500 нМ МТХ. После окончания процедуры селекции и проведения проверки стабильности культур стало возможным сравнение динамики селекции каждой из них. Для культур S1 и S3 селекция начиналась с концентрации 10нМ и заканчивалась 500 нМ. Значимое расхождение ($p=0,01$) значений уровней продукции рекомбинантных антител против ФНО-а в ходе селекции началось с концентрации основного селективного агента МТХ равной 250 нМ (**Рисунок 17В**). Белковый гель-электрофорез с денситометрией показывает наличие целевого белка для обеих культур клеток и его чистоту (**Рисунок 17Г**).

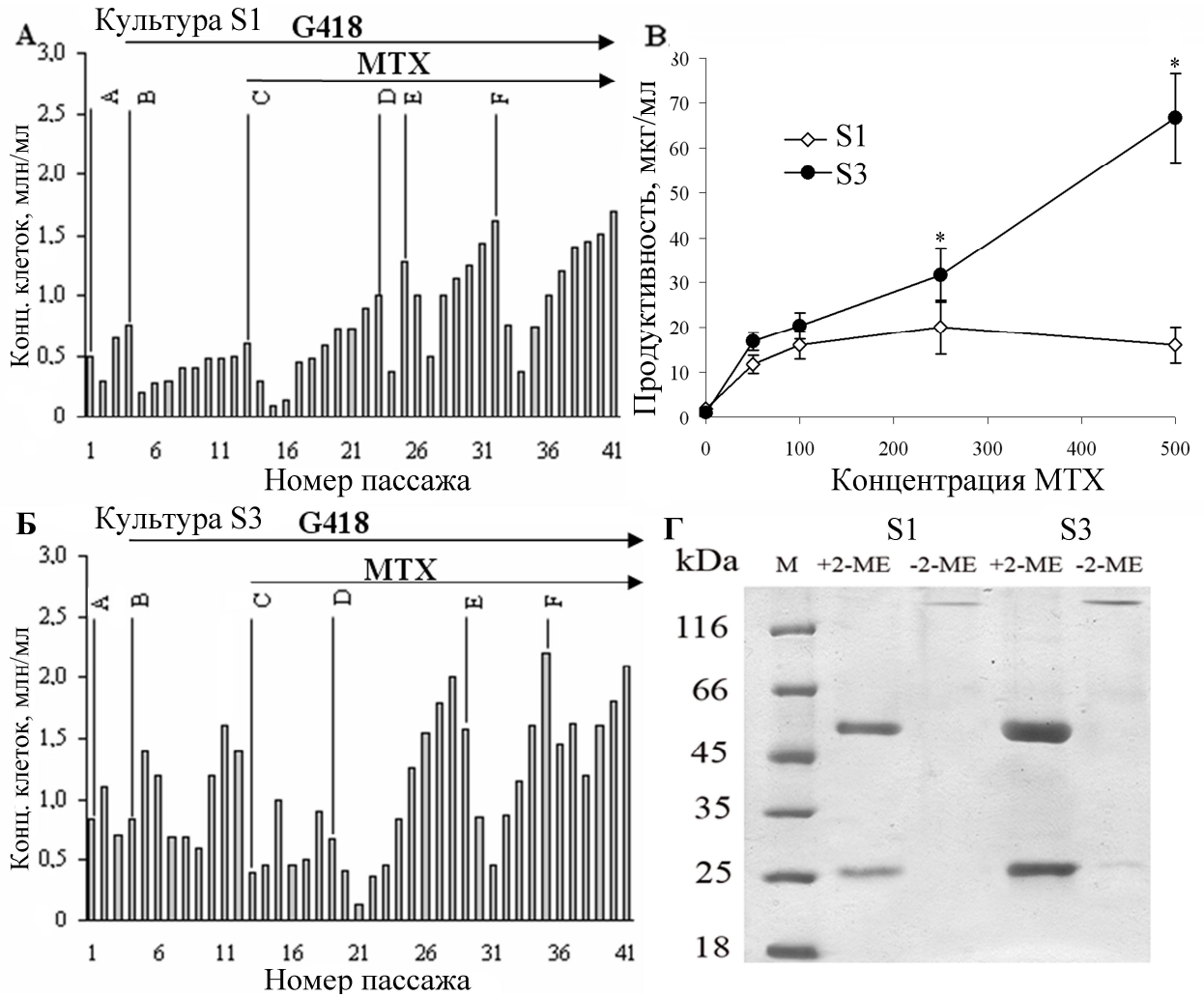


Рисунок 17. Динамика селекции клеточных линий CHO DG44, трансфицированных плазмидами рOptiCHO-НС и рсDNA 3.3-LC (А); рOptiCHO-LC и рсDNA 3.3-НС (Б), где

а CD OptiCHO

б CD OptiCHO + G418 500 мкг/мл

с CD OptiCHO + G418 500 мкг/мл + 50 нМ MTX

д CD OptiCHO + G418 500 мкг/мл + 100 нМ MTX

е CD OptiCHO + G418 500 мкг/мл + 250 нМ MTX

ф CD OptiCHO + G418 500 мкг/мл + 500 нМ MTX

В. Сравнение продукции клеточных линий S1 и S3 в ходе селекции.

Г. Электрофореграмма образца антител, выделенных из супернатанта культур

S1 и S3. +2-ME — в буфере с 2-меркаптоэтанолом; -2-ME — без 2-меркаптоэтанолом.

4.7 Эффект от увеличения концентрации МТХ свыше 500 нМ и введение дополнительных питательных веществ в ходе культивирования

Метотрексат оказывает прямое достоверное влияние на эффективность экспрессии рекомбинантных антител в стабильных культурах клеток СНО. Поэтому было предположено, что дальнейшая селекция линии клеток метотрексатом в концентрации 1000 нМ положительно скажется на уровне продукции антител в среду культивирования. Для этого обе культуры, успешно прошедшие селекцию на среде, содержащей 500 нМ МТХ, были дополнительно селектированы 1000 нМ МТХ. При проведении селекции линий S1, прошедших и не прошедших сортирование, было отмечено резкое снижение скорости удвоения популяции (данные не приведены). Линии S3c1 и S3c2, прошедшие сортирование, после прохождения селекции 500 нМ МТХ, показали рост продукции в 138% (**Рисунок 18Б**). Исходная линия S3, не прошедшая сортирование, но успешно прошедшая селекцию 500 нМ МТХ, при проведении повторного этапа селекции с применением 1000 нМ МТХ показала существенное снижение продукции (**Рисунок 18Б**). Предполагается, что это может быть результатом снижения вариативности клеточной популяции в части соотношения количества генов лёгкой и тяжёлой цепей антитела. Скорость удвоения популяции в культуре S3 при селекции 1000 нМ относительно 500 нМ не изменилась. Также вероятно, что клетки с низким числом копий, могут быть более восприимчивы к подавлению эффекта высокой дозы метотрексата.

Также была предпринята попытка увеличения продукции рекомбинантных антител в среду культивирования для линии S3 путём добавления дополнительных количеств питательных веществ. Такими питательными веществами были глюкоза и дрожжевой экстракт (ДЭ), а также комбинация этих веществ. Применение одной подкормки в виде раствора дрожжевого экстракта позволило достичь увеличения продукции равного 140% (**Рисунок 18Г**).

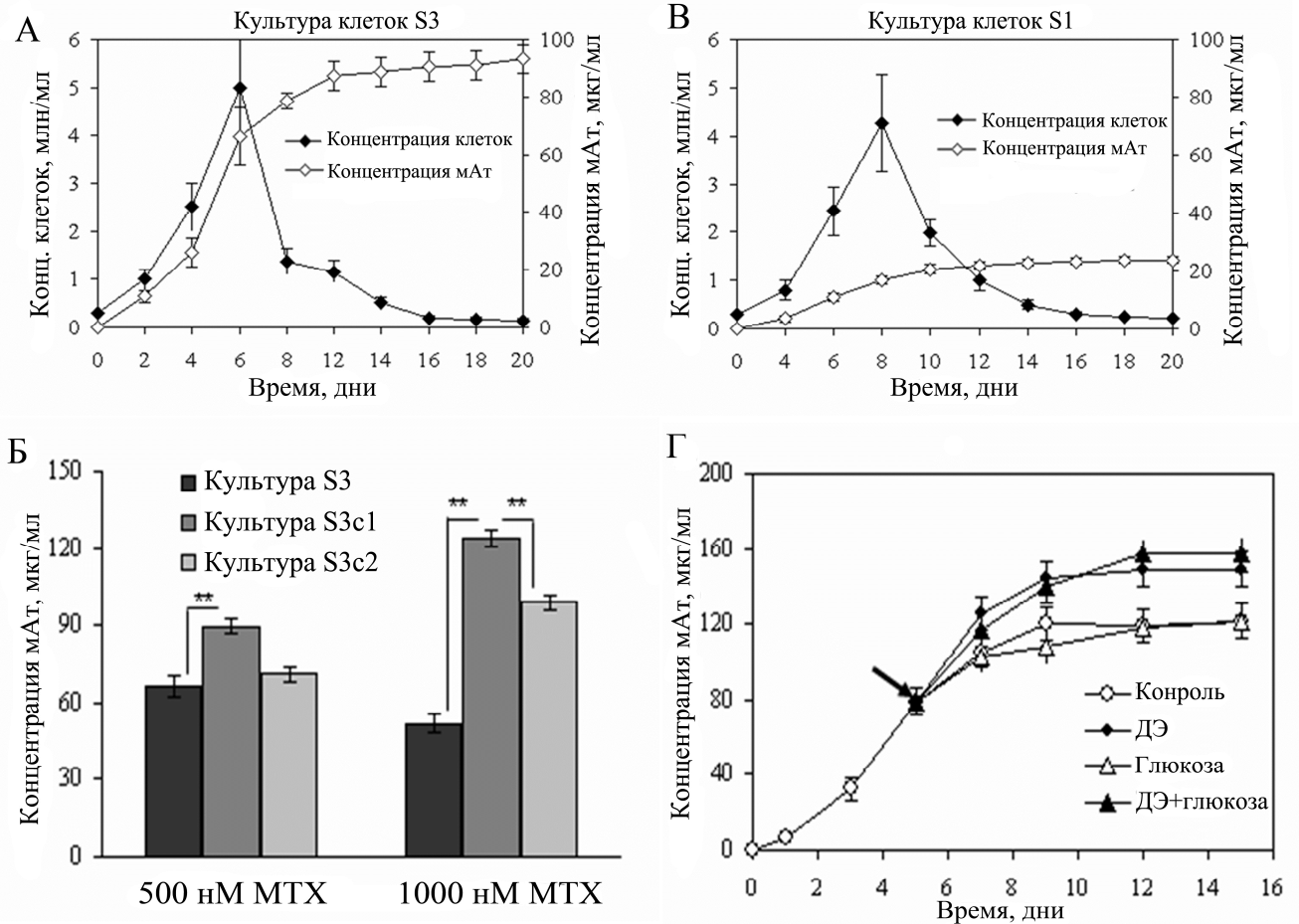


Рисунок 18. Результаты оптимизации культур S1 и S3 с помощью цитосортировки и подбора компонентов питательных сред

А, В. Культивирование линий клеток S3 и S1 соответственно, прошедших цитосортировку для получения максимального выхода антител.

Культивирование линий проводилось в среде CD OptiCHO

Типичная кривая накопления рекомбинантных антител в среде культивирования и изменения количества клеток. Были использованы линии S3c1 и S1c1, которые прошли селекцию на среде OptiCHO с добавлением 500 мкг/мл антибиотика G418, 0,18% PL-68, 8 мМ L-Глутамин и 500 нМ метотрексата, а после чего были отсортированы на проточном цитосортере для выделения пула высокопродуктивных клеток. Культивирование проводилось на той же среде без добавления метотрексата. Культивирование прекращали при критическом уменьшении количества клеток в культуре.

Б. Влияние цитосортировки и увеличение концентрации МТХ в среде культивирования на продукцию культуры S3

Увеличение концентрации МТХ для культуры S3 свыше 500 нМ (темно-серый граф) до 1000 нМ МТХ (светло-серый граф) приводило к достоверному уменьшению продукции антител. Культура S3c1, прошедшая цитосортировку показывает достоверное увеличение продукции антител.

Г. Влияние добавления дополнительных питательных веществ в момент культивирования линии S3c1 1000 нМ МТХ

Добавление питательных веществ, а именно глюкозы, глутамина, дрожжевого экстракта и их смеси производили в момент предполагаемого начала истощения питательной среды. В качестве отрицательного контроля применялась культура S3c1 1000 нМ МТХ, выращиваемая без добавления питательных веществ в процессе культивирования.

4.8 Анализ и отбор клонов культуры

Для ускорения и повышения эффективности процесса селекции клонов клеточной линии СНО — продуцента рекомбинантных антител было решено использовать флуоресцентный метод анализа продуктивности клонов в сочетании с автоматизированной процедурой отбора. После проведения процедуры трансфекции и первоначальных этапов селекции культуры СНО, продуцента химеризованных антител против ФНО-а, стало возможным проведение клонального анализа культуры с использованием автоматической системы отбора колоний. Данная система позволяет анализировать пул рассеянных клеток и отбирать претендентов для последующего выращивания.

Для анализа продуктивности клонов могут быть использованы антитела с ковалентно пришитыми флуоресцирующими молекулами (FITC, GFP, RFP или другими). В случае, если клетки стабильно трансфицированы плазмидами, кодирующими лёгкую и тяжёлую цепи антител, детектирующими антителами

могут являться вторичные антитела к константному домену тяжёлой цепи антитела, продуцируемого клетками.

После проведения анализа появлялась возможность выбора группы клеток для отбора с помощью автоматизированной системы отбора клонов кандидатов в суперпродуценты. Для этого выбирали параметры, по которым будет производиться отбор клеток, определение их жизнеспособности, а также относительной скорости биосинтеза и эффективности секреции синтезируемых антител в среду культивирования.

Автоматическая система отбора колоний эукариотических клеток ClonePIX FL (Genetix, Великобритания) позволяет анализировать пул рассеянных клеток и отбирать претендентов для последующего выращивания. Для этих целей клетки засевают в полутвёрдую среду, в которой присутствуют все необходимые для роста клеток компоненты.

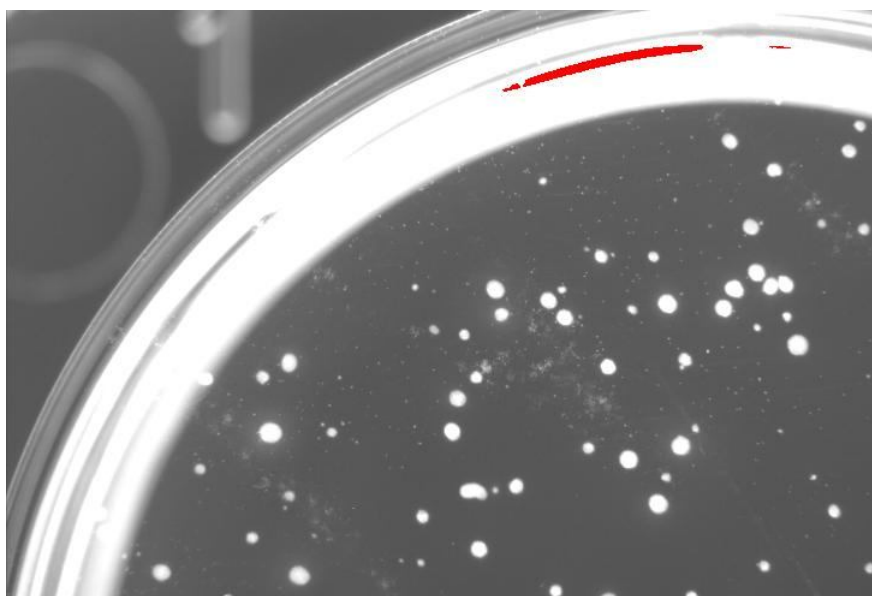


Рисунок 19. Фрагмент изображения культуральной чашки. Колонии клеток-продуцентов в видимом свете

На первом этапе анализировались взаимное положение колоний эукариотических клеток, форма колонии и ровность границы колонии, плотность,

относительное положение в лунке. На основе полученных данных делался вывод о целесообразности отбора конкретной колонии (**Рисунок 19**). Следующим этапом анализа является постадийный анализ колоний-кандидатов с помощью флуоресцентных источников света с набором фильтров для обнаружения ореола флуоресценции вокруг колоний. Наличие данного ореола свидетельствует о продукции иммуноглобулинов в среду культивирования и медленное концентрическое распространение их за счет диффузии (**Рисунок 20**).

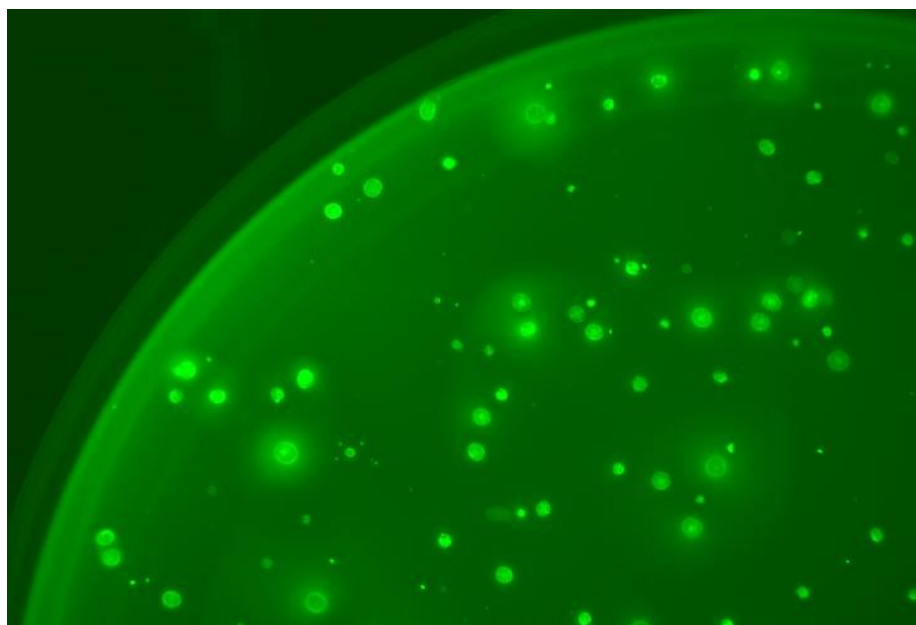


Рисунок 20. Фрагмент изображения культуральной чашки. Колонии клеток-продуцентов при использовании флуоресцентных источников света с фильтром для детекции FITC метки

Задание параметров отбора индивидуальных колоний производилось для трех различных групп клеток. Каждая из групп отбиралась индивидуально из двух отдельных 6-луночных планшетов (**Рисунок 21**).

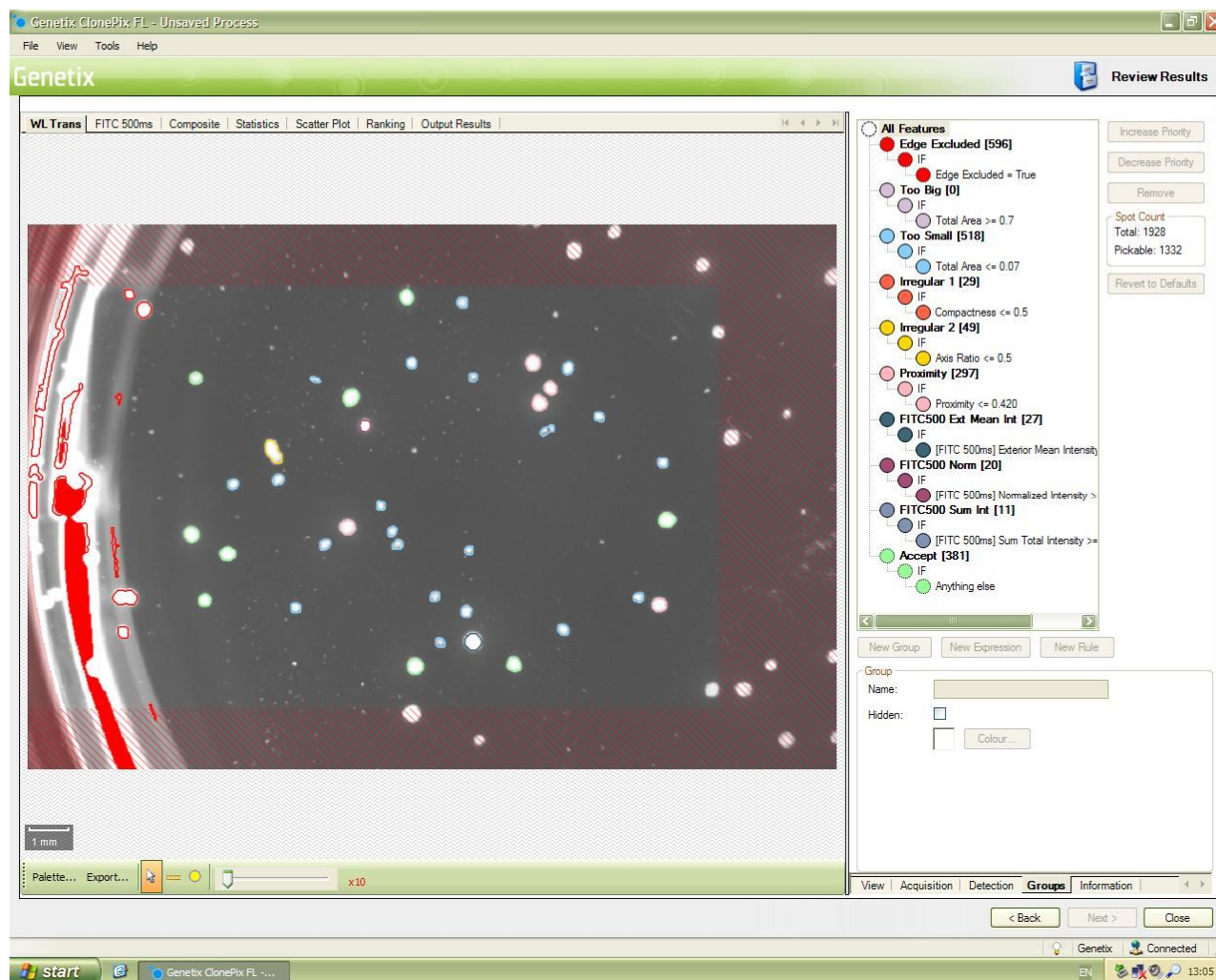


Рисунок 21. Фактические экспериментальные параметры программного обеспечения системы ClonePix FL для клеток при отборе кандидатов в суперпродуценты

Колония клеток, подвергаясь исключению из группы или включению в группу, окрашивается в цвет, соответствующий цвету группы.

При анализе клонов оценивают взаимное положение колоний эукариотических клеток, форму колонии и ровность границы колонии, плотность, относительное положение в лунке. На основе полученных данных делают вывод о целесообразности отбора конкретной колонии. Факторами, определяющими возможность отбора колонии, являются уровень флуоресценции индивидуальной колонии, положение колонии на чашке и взаимное положение колоний, а также предположение о моноклональности каждой группы клеток. Последний фактор крайне важен при отборе индивидуального клона кандидата в суперпродуценты,

т.к. отобранные клоны должны быть строго моноклональны. При отборе клеток исследователь должен быть уверен, что клетки отобранного кандидата в суперпродуценты произведен из единственной клетки. Данное обстоятельство напрямую влияет на продукцию клеток в момент их посева и тестирования продукции антител в небольших объемах питательной среды. Повторное клонирование индивидуальных клонов остаётся возможным, но увеличивает срок отбора кандидатов, усложняет и замедляет работу.

Следующим этапом анализа является постадийный анализ колоний кандидатов с помощью флуоресцентных источников света с набором фильтров для обнаружения ореола флуоресценции вокруг колоний. Наличие данного ореола свидетельствует о продукции иммуноглобулинов в среду культивирования и медленное концентрическое распространение их за счет диффузии.

Общий вид результата анализа колоний клонов приведён на **Рисунке 22**.

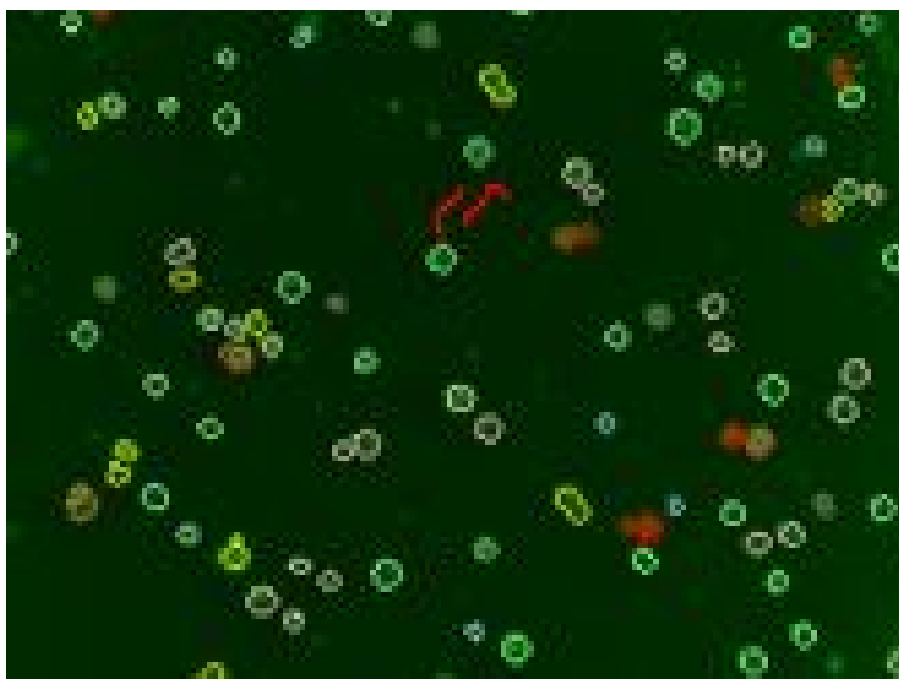


Рисунок 22. Пример результата анализа колоний ClonePix FL с разделением клонов на группы

Фрагмент лунки в свете длиной волны 488 нм.

Антитела, продуцированные клетками, связывались с вторичными антителами, несущими довесок в виде флуоресцирующего соединения FITC. Это важное обстоятельство позволило идентифицировать клоны, продуцирующие существенное количество иммуноглобулинов, и сравнить их между собой. Предполагалось, что чем больше и ярче ореол свечения при освещении плашки, тем большее количество иммуноглобулинов данный клон способен продуцировать в среду культивирования. Система ClonePIX FL и входящее в комплект поставки программное обеспечение обладает достаточной гибкостью для точного определения рейтинга каждого отдельного клона.

После наложения двух групп полученных изображений был проведен дополнительный анализ и сопоставление данных. Все анализируемые клетки были распределены по группам в зависимости от критичности параметров, по которым производился отбор колоний. Это обстоятельство позволяет сортировать клетки и выбирать из общей массы проанализированных клеток необходимые исследователю для создания клона с высокой продукцией требуемого белка.

Полученные после проведения селекции и клонирования культуры клонов-продуцентов значительно отличаются от родительской культуры по уровню продукции рекомбинантных антител в среду культивирования. Как и в случае отбора наиболее продуктивных клонов с помощью проточной цитофлуориметрической сортировки [153], предполагается, что наиболее продуктивные колонии попали в группу отбора. Ранговые графики представлены на **Рисунок 23А, В**). Сравнительная гетерогенность, т.е. разница между наиболее продуктивными и наименее продуктивными клетками в культуре для линий клеток S3 и S11 сильно различалась в ходе эксперимента, что может быть связано с различными методами селекции культур. Так, гетерогенность культуры S3 (**Рисунок 23А**) типично была выше таковой у культуры S11 (**Рисунок 23В**), что позволило выбрать из культуры-продуцента наиболее продуктивные клоны.

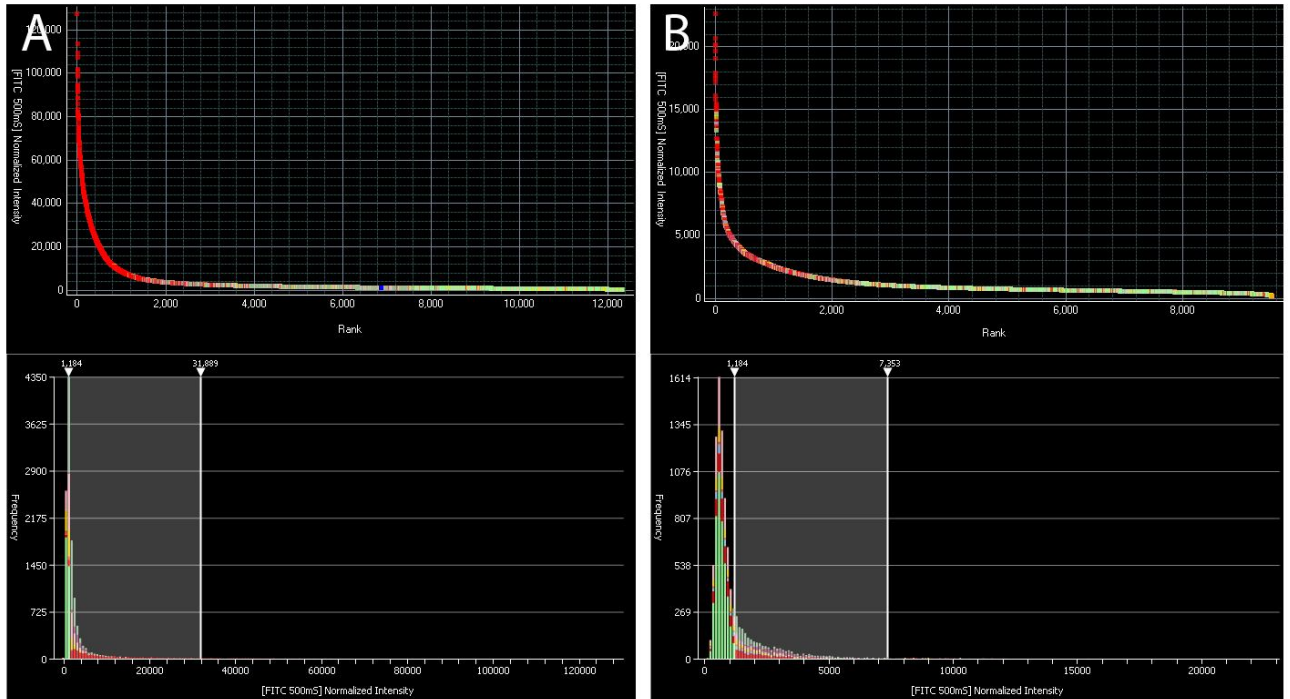


Рисунок 23. Сравнительная гетерогенность культур S3(A) и S11(B)

Индивидуальные клоны каждой культуры на этапе отбора после проведения селекции 5 нМ МТХ обозначены на диаграмме цветными точками. Могут быть прикрыты соседними клонами.

На **Рисунке 23** в обозначенной для выделения серой зоне нижних частей графика находится по 160 клонов, удовлетворяющих требованиям по размеру, форме, относительному расположению в лунке и относительной активности флуоресценции.

Графики данных флуоресценции индивидуальных клонов приведены в различных масштабах, что обусловлено особенностью функционирования оригинального программного обеспечения. Однако, можно заметить, что разница уровня флуоресценции между проанализированными наиболее и наименее продуктивными клонами на диаграммах доходит до приблизительно 6 раз.

Культура S3 более гетерогенна по уровню флуоресценции (**Рисунок 23А**), чем S11 (**Рисунок 23В**), что можно объяснить значительно большей разницей между уровнем флуоресценции максимально и минимально флуоресцирующих клонов.

Дальнейшее клонирование и проверка продукции индивидуальных клонов подтверждают данную закономерность.

4.9 Ростовые диаграммы клонов

Построение динамики роста культур клеток в каждой лунке позволяет визуально оценить ростовые характеристики каждого клона и сравнить их с данными, полученными от других клонов (**Рисунок 24**). Программное обеспечение данного оборудования позволяет определить достижение каждым клоном состояния конfluence и отбирать от соответствующих клонов порцию кондиционированной среды для последующего ИФА-анализа. В результате ИФА выбираются клоны, способные производить относительно большое количество антител.

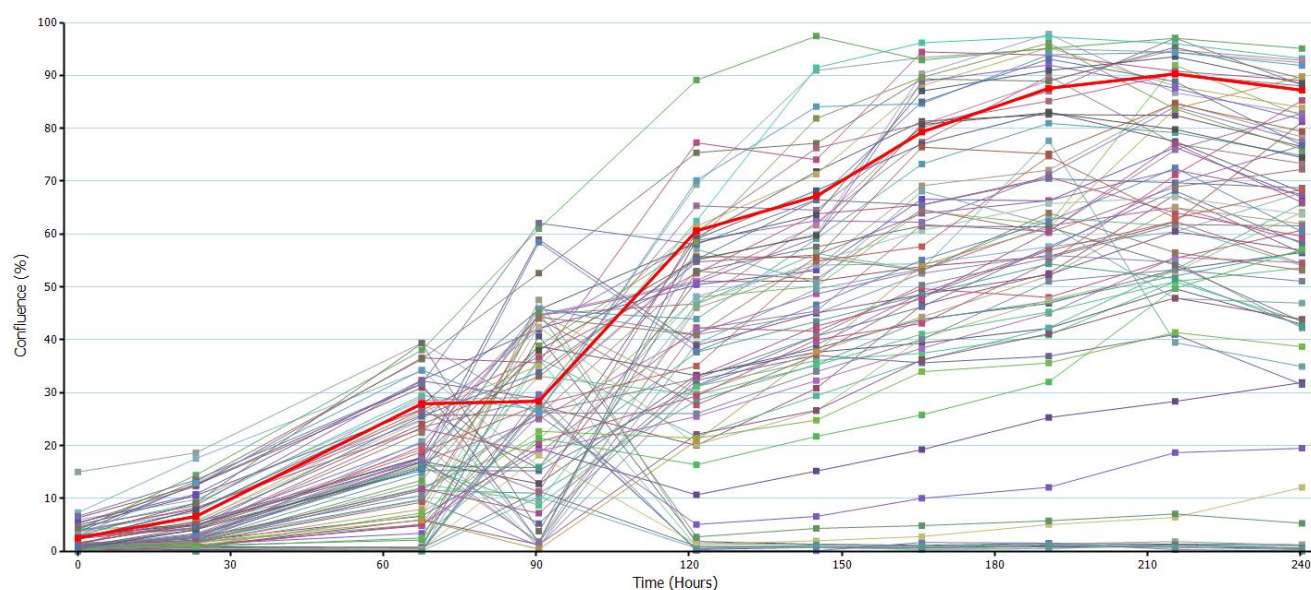


Рисунок 24. Сводный график ростовых характеристик индивидуальных клонов стабильно продуцирующей культуры в процессе получения культур индивидуальных клонов. Изображение получено с использованием автоматической системы визуализации индивидуальных клонов

После отбора индивидуальных клонов культивирование производилось без замены питательной среды в 96-луночных планшетах для суспензионных культур в стационарных условиях при 37°C в CO₂-инкубаторе при 8% CO₂.

При достижении 60–70% конфлюэнтности супернатант отбирался из лунки для анализа содержания иммуноглобулинов. Такой анализ позволяет соотнести количество клеток в лунке и концентрацию иммуноглобулинов. Фотографирование растущих клонов производилось ежедневно (**Рисунок 25**).

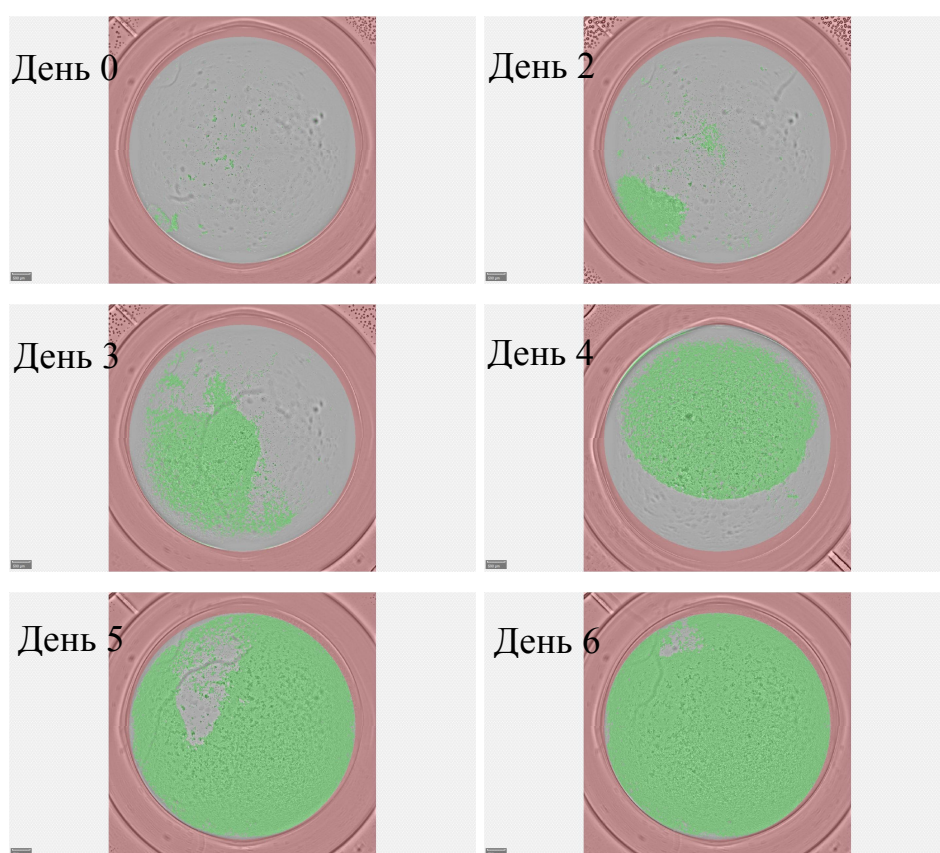


Рисунок 25. Динамика конфлюэнтности клона-продуцента в лунке 96-луночного планшета (опознанные программным обеспечением клетки обозначены зеленым цветом)

В ходе клонирования культуры S3-5nM были получены 480 клонов, характеризующихся различным уровнем экспрессии. Среди них были выбраны 4 наиболее продуктивных (по данным анализа кондиционированной среды

XP Media в 96-луночном планшете) (**Рисунок 26**). Данные культуры были масштабированы до уровня 30 мл культуры. Окончательная проверка продуктивности полученных культур была проведена в полной среде в 30 мл культуральной среды.

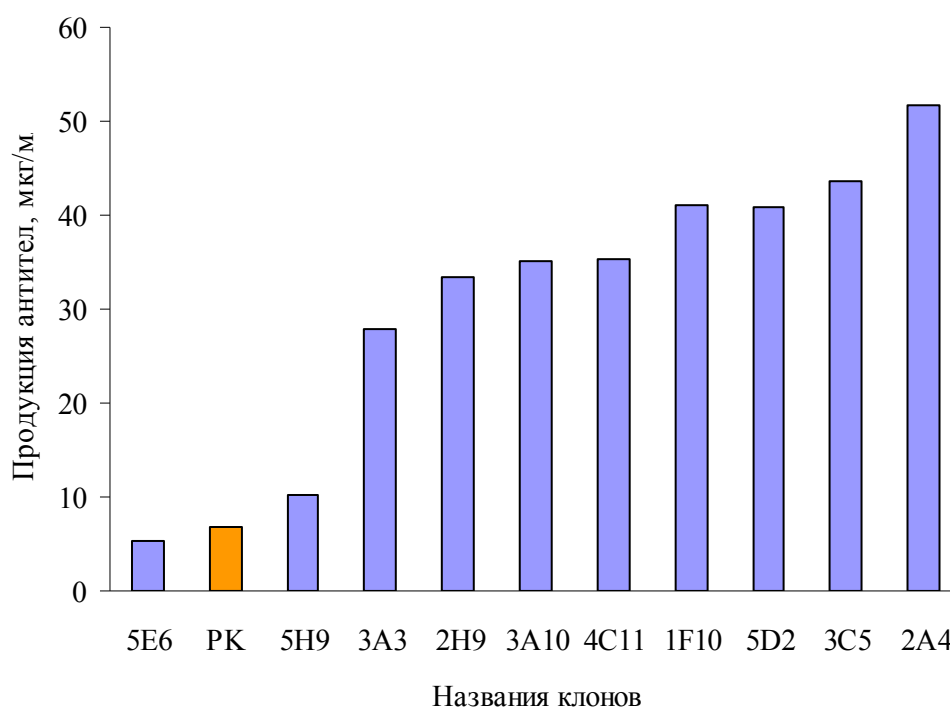


Рисунок 26. Относительная продукция родительской культуры S3-5 нМ (PK) и её дочерних клонов

Данные по результатам ИФА. Культивирование проводилось в 30 мл питательной среды в течение 14 дней. В полной питательной среде без добавления селективных агентов.

В результате клонирования линии S3-5 нМ, стабильно продуцирующей антитела в среде культивирования, был получен набор клонов, характеризующийся различным уровнем экспрессии (**Рисунок 26**). Различия в максимальной продукции антител отдельными клонами могут быть обусловлены тем, что в процессе селекции увеличение количества генов каждой из цепей антитела могло происходить несогласованно.

Использование данной методики культивирования и селекции клеточных линий позволяет в короткие сроки (сравнимые с полноценной селекцией) получить субклоны, уровень максимальной продукции которых сопоставим с уровнем максимальной продукции тех же линий, прошедших селекцию с использованием рекомендованных производителем концентраций селективных агентов. Субклоны линии S3, в частности субклон S3-2A4, близки по уровню экспрессии к родительским клонам при значительно меньшем давлении селективных агентов (Таблица 4).

Таблица 4. Сравнение времени, затраченного для получения стабильных линий продуцентов химеризованных антител к ФНО-а человека

Название культуры	Метод селекции (концентрации селективных агентов)	Максимальная продукция линии	Затраченное время
S3	G418 (500 мкг/мл) MTX (500 нМ)	64 мкг/мл	~8 месяцев
S3-2A4	G418 (500 мкг/мл) MTX (5 нМ)	51,6 мкг/мл	~2.5 месяца

При селекции линий-продуцентов для последующего клонирования были использованы концентрации MTX, значительно меньшие рекомендованных поставщиком клеточных культур. Данное обстоятельство позволяет продолжить работу с клонами-продуцентами путем увеличения концентрации селективных агентов (G418 и MTX) и произвести дополнительные этапы селекции и отбора наиболее производительных субклонов. Исходя из этого можно предположить, что при достижении концентраций селективных агентов до уровня 500 нМ для MTX и 500 мкг/мл для G418, продуктивность полученных потомков линий-продуцентов с применением описываемой методики клонирования клеточной

линии может значительно превосходить уровень продукции линии, полученной от того же источника без использования данной методики.

4.10 Оценка эффективности бипромоторной системы экспрессии

На основе вектора pViPr были сконструированы две экспрессионные плазмиды, несущие одновременно лёгкую и тяжёлую цепи антител в различных ориентациях.

Было последовательно получено несколько клонов обеих культур S3 и S11. Получение культур из клонов, чередовали с дополнительными этапами селекции с применением увеличивающихся концентраций МТХ. Для данной задачи были применены две пары рекомбинантных плазмид на основе вектора pViPr, в двух из которых - pViPr-2 и pViPr-13 - гены цепей антитела находились однонаправленно, а в pViPr-8 и pViPr-11 - разнонаправленно.

4.11 Выбор исходной культуры для дальнейшей селекции

При использовании биплазмидных системы экспрессии для создания линии-продуцента гетеросубъединичных белков, к которым относится химерное антитело против ФНО-а, рост числа копий генов легкой и тяжелой цепей антитела достигается за счет использования двух селективных маркеров. При этом теоретически возможно, что увеличение копийности генов антител в процессе селекции может происходить неравномерно и дополнительно усугубляться тем, что экспрессионные кассеты, содержащие гены легкой и тяжелой цепи, будут встраиваться в участки хромосомы, отличающиеся по своей транскрипционной активности.

Для того, чтобы оценить влияние данных факторов, было проведено сравнение процессов получения стабильных клеточных линий для биплазмидной и бипромоторной систем экспрессии, схематически представленных на **Рисунке 3**.

Прежде чем, проводить сравнение бипромоторной и биплазмидной систем экспрессии между собой, было решено исследовать, какой из вариантов плазмиды рViPr-ABTNF (**Рисунок 3Г, Д**) является наиболее оптимальным. Для трансфекции культуры CHO DG44 использовали бипромоторные плазмиды в прямой («голова-хвост») и в обратной («голова-голова») ориентации транскрипции. В результате селекции были отобраны по 2 культуры для каждого вида бипромоторной экспрессионной кассеты.

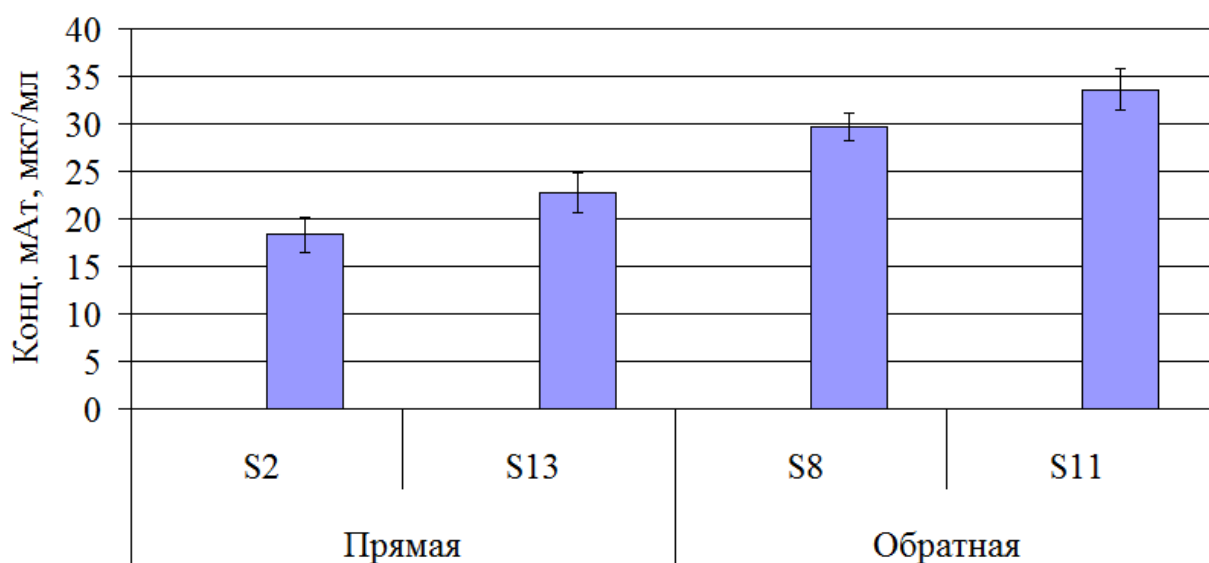


Рисунок 27. Сравнение максимальной продукции культур, полученных на основе вариантов бипромоторных плазмид на стадии селекции 25 нМ МТХ
 Культуры, полученные на основе прямой последовательности генов "голова-хвост" - S2 и S13 и обратной последовательности генов в составе плазмиды "голова-голова" - S8 и S11.

На основании полученных данных, нами было сделан вывод о наибольшей перспективности культуры S11. Данная культура была использована для последующих раундов селекции и клонирования (**Рисунок 27**).

4.12 Сравнение биплазмидной и бипромоторной систем экспрессии

После прохождения процедуры клонирования культуры данные её продуктивности сравнивали с исходной родительской культурой клеток. Каждая культура, являющаяся потомком культуры S11, прошла чередующиеся этапы селекции 5, 50, 500 и 2000 нМ MTX. Культура, являющаяся потомком культуры S3, прошла чередующиеся этапы селекции 5, 50, 500 и 2000 нМ MTX. Культура, являющаяся потомком культуры S3, прошла чередующиеся этапы селекции сочетанием 500 мкг/мл G418 с 5, 50, 500 нМ MTX и 1000 мкг/мл G418 в сочетании с 2000 нМ MTX (**Рисунок 28**).

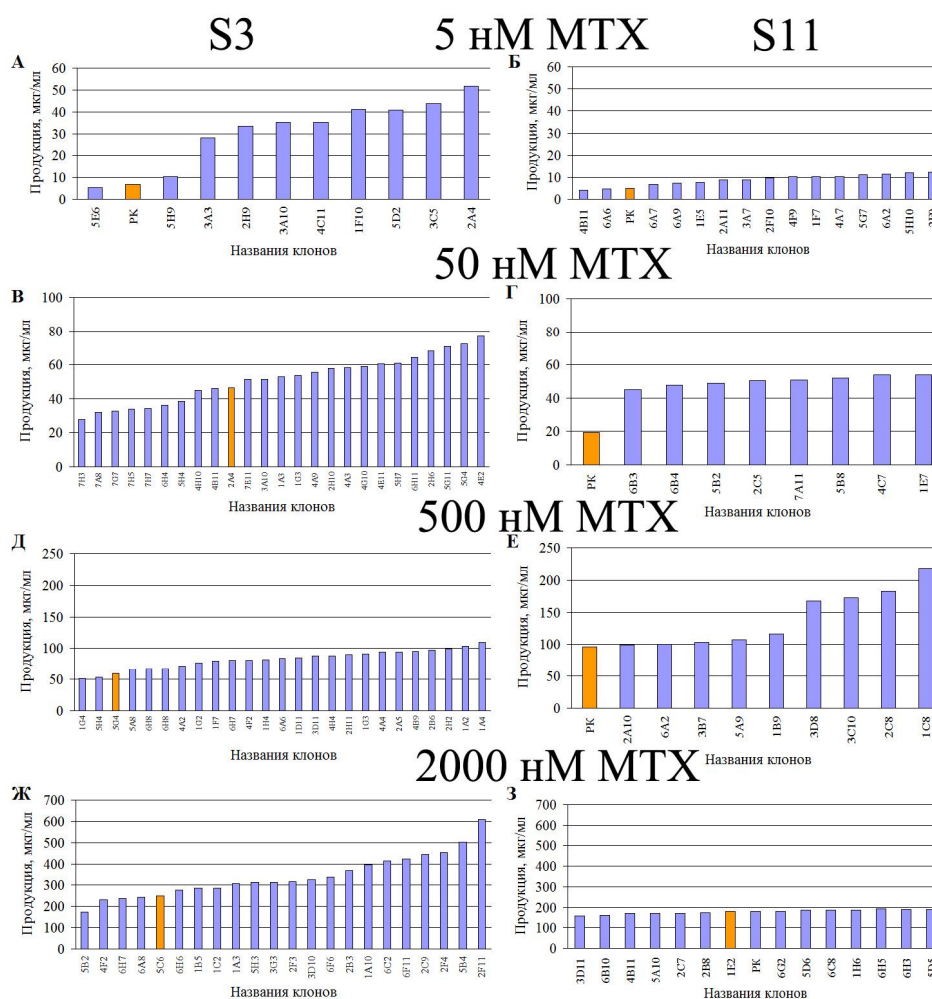


Рисунок 28. Продукция каждого из последовательных клонов-продуцентов (голубые столбцы), и уровень продукции родительских культур (оранжевые столбцы) для культур потомков линий S3 (А, В, Д, Ж) и S11 (Б, Г, Е, З) Представлены графики отбора культур клеток при проведении этапа селекции культуры А, Б - 5 нМ; В, Г - 50 нМ; Д, Ж - 500 нМ; Е, З - 2000 нМ. Цветом

выделены столбцы диаграммы, соответствующие уровню продукции рекомбинантного антитела родительской культурой клеток.

Предполагается, что клетки при увеличении концентрации селективного агента пропорционально увеличивают количество генов легкой и тяжелой цепи [154, 155]. В этом случае можно утверждать, что при увеличении до некоторого предела [153] концентрации селективных агентов увеличивается уровень продукции целевого антитела.

Различия в гетерогенности возникают из-за метода селекции культур. Так, в случае культуры S3 (**Рисунок 28 А, В, Д, Ж**) селекция велась с использованием двух различных селективных агентов — МТХ и G418, направленных на селекцию клеток, содержащих плазмиды с генами лёгкой и тяжёлой цепей антитела против ФНО-а отдельно. Напротив, при селекции линии клеток S11 (**Рисунок 28Б, Г, Е, З**) селекция велась по пути, предполагающим эквимолярное увеличение концентрации генов легкой и тяжелой цепей данного антитела. Параллельный анализ культур с применением концентрации МТХ равной 100 нМ показал, что гетерогенность культуры S11 практически не изменилась. Клоны-продуценты, выделенные из культуры S11, в отличие от клонов культуры S3, также прошедшей селекцию 2000 нМ МТХ, показывают уровень продукции рекомбинантных антител, сравнимый с родительской культурой. Данный факт означает невозможность дальнейшего увеличения продукции культуры с использованием методики с применением плазмид на основе pViPr, рассматриваемой в данной работе. Дальнейшее же увеличение концентрации селективного агента приводит к уменьшению продукции клеточной линии подобно описанным ранее случаям [153].

4.13 Оптимизация среды культивирования

Для определения концентрации белковых компонентов неживотного происхождения, необходимых для роста культуры продуцента и продукции

целевого белка использовали стоковые растворы рекомбинантных белков. Рекомбинантные белки-добавки, рЧСА и рТФР, были получены и очищены с использованием гель-фильтрации методом, описанным в работах [149, 156] и растворены в фосфатно-солевом буфере для получения стандартных растворов, концентрация которых приведена в **Таблица 5**.

Таблица 5. Концентрации стоковых растворов белков и низкомолекулярных компонентов, входящих в состав бессывороточной среды культивирования

Компонент	Молекулярная масса, Да	Концентрация, мг/мл
Инсулин	5808	10
Трансферрин	80000	2.8
Селенит натрия	173	0,1
ЧСА	66500	140

Каждый из белковых компонентов и низкомолекулярных добавок вносили в среду культивирования с применением фильтров в виде шприц-насадок с диаметром поры 0,22 мкм, что обеспечивало стерильность. Перед добавлением их хранили при +4°C.

Соотношения компонентов среды представлены в **Таблице 6**. В качестве контроля продуктивности клеточной культуры при выращивании на бессывороточной среде использовали комплексную добавку инсулин-трансферрин-селенит натрия (ITS, Gibco, США) в конечной концентрации, равной 1% (1 : 1 : 1) и 3% (3 : 3 : 3).

Для приготовления сред стоковые растворы добавляли в базовую среду культивирования IMDM в количествах, представленных в **Таблице 6**. Для каждой из культур клеток в среду роста также вносили 8 мМ L-глутамин и 0,1% Pluronic F-68. После внесения белковых и низкомолекулярных компонентов среды хранили не более 14 суток при +4 °С. Конечная концентрация белковых и небелковых компонентов в разрабатываемых средах представлена в **Таблице 7**.

Таблица 6. Соотношение компонентов в тестируемой бессывороточной среде (приведён объём в мл для приготовления 1 л среды роста)

Компонент	Соотношение компонентов в среде, относительно концентрации. в ITS								
	3:1:1	1:3:1	1:1:3	1/3:1:1	1:1/3:1	1:1:1/3	1:1:1	3:3:3	1/3:1/3:1/3
Инсулин	3,000	1,000	1,000	0,333	1,000	1,000	1,000	3,000	0,333
Трансферрин	1,964	5,893	1,964	1,964	0,655	1,964	1,964	5,893	0,655
Селенит натрия	0,067	0,067	0,201	0,067	0,067	0,022	0,067	0,201	0,022
ЧСА	7,14	7,14	7,14	7,14	7,143	7,14	7,14	7,14	7,14

«-» компонент не добавлялся

Таблица 7. Соотношение компонентов в тестируемой бессывороточной среде (мг компонента/количество концентрата, необходимого для приготовления 1 л среды роста)

Компонент	Соотношение в среде, относительно концентрации ITS								
	3:1:1	1:3:1	1:1:3	1/3:1:1	1:1/3:1	1:1:1/3	1:1:1	3:3:3	1/3:1/3:1/3
Инсулин	30	10	10	3,33	10	10	10	30	3,33
Трансферрин	5,5	16,5	5,5	5,5	1,8	5,5	5,5	16,5	1,8
Селенит натрия	0,0067	0,0067	0,0201	0,0067	0,0067	0,0022	0,0067	0,0201	0,0022
ЧСА	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

«-» компонент не добавлялся

Для выявления наивысшей удельной продуктивности клеточной линии-производителя при культивировании в условиях разрабатываемой бессывороточной

среды были проведены 3 серии независимых культивирований. Усреднённые данные представлены на **Рисунке 29**.

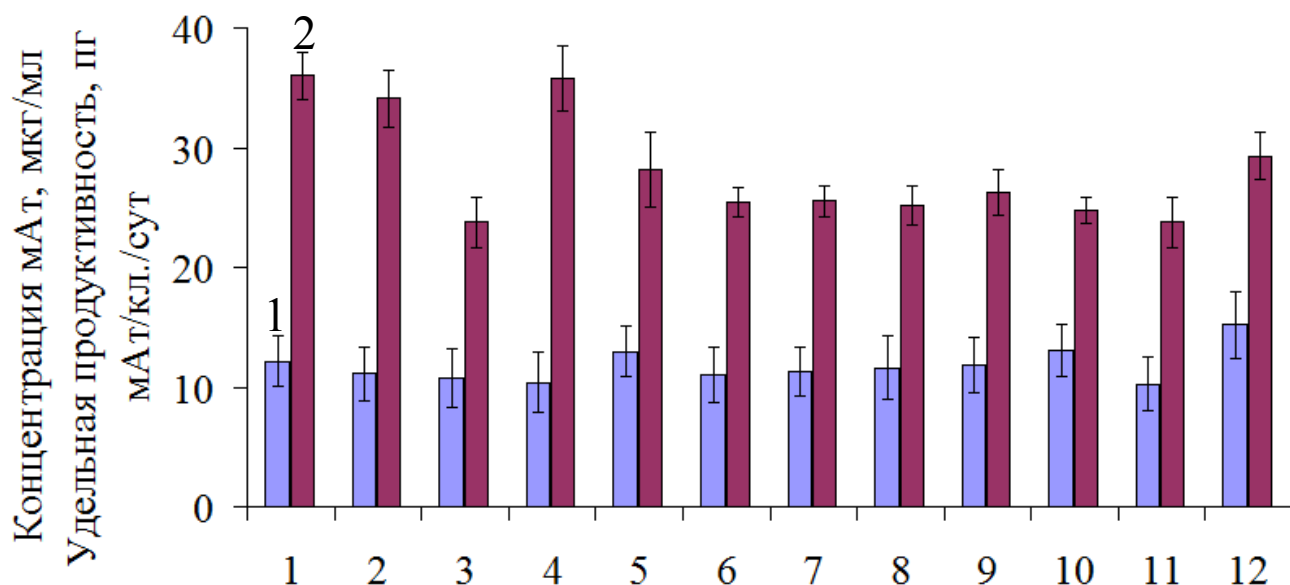


Рисунок 29. Сравнительная абсолютная (1) и удельная (2) продукция клеток линии-продуцента мАт за 44 ч при выращивании на среде IMDM с различным сочетанием компонентов (инсулина, трансферрина и селенита натрия): 1 - IMDM 3 : 1 : 1, 2 - IMDM 1 : 3 : 1, 3 - IMDM 1 : 1 : 3, 4 - IMDM ½ : 1 : 1, 5 - IMDM 1 : ½ : 1, 6 - IMDM 1 : 1 : ½, 7 - IMDM 1 : 1 : 1, 8 - IMDM 3 : 3 : 3, 9 - IMDM ½ : ½ : ½, 10 - IMDM+ITS 3 : 3 : 3, 11 - IMDM+ITS 1 : 1 : 1, 12 – OptiCHO

1 – концентрация мАт в среде культивирования после 44 ч (мкг/мл), 2 – удельная продуктивность культуры (пг мАт/кл./сут).

Из **Рисунка 29** следует, что накопление продукта в начале культивирования происходило равномерно для каждой из тестируемых сред культивирования. Однако, относительно контроля удельная продуктивность линий, культивируемых с избытком инсулина или трансферрина, оказалась выше, чем для контрольного образца. Это могло свидетельствовать о компенсации изменения скорости роста культуры удельной продуктивностью.

Для получения максимальной концентрации мАт культивирование продолжали в течение 14 сут, когда происходило истощение питательных веществ в среде (**Рисунок 30**).

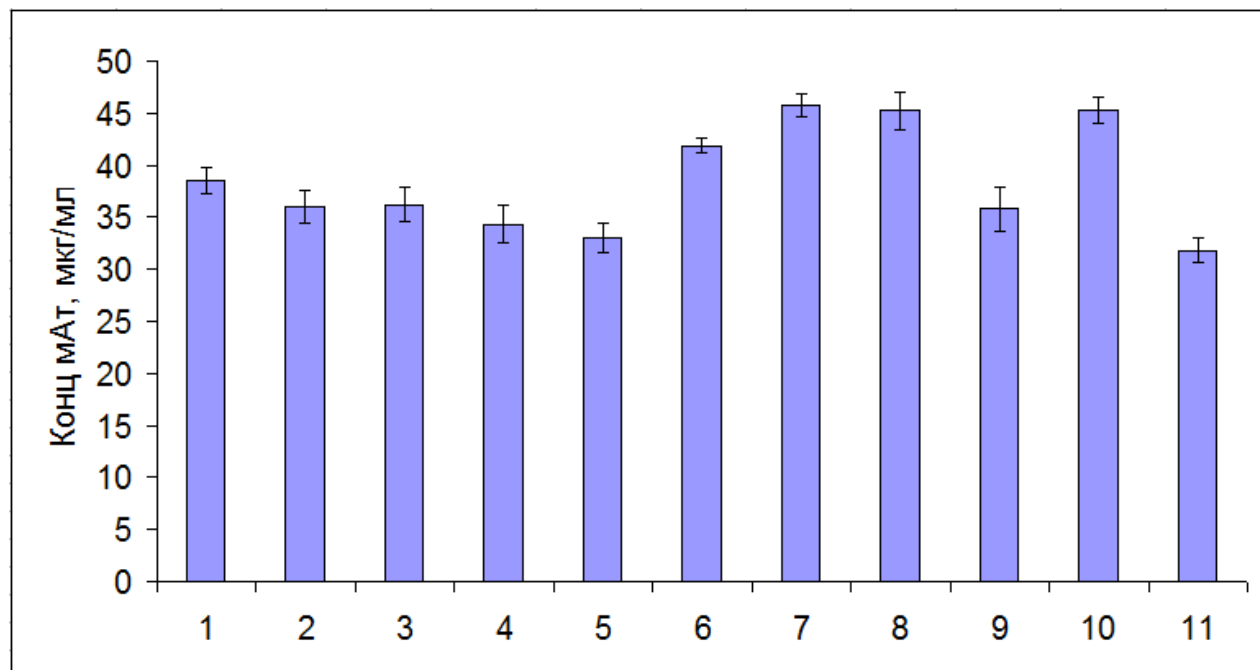


Рисунок 30. Конечная концентрация мАт в среде после 14 суток культивирования на средах с различным соотношением компонентов среды IMDM (даны средние результаты 4 независимых культивирований)

1 - IMDM 3 : 1 : 1, 2 - IMDM 1 : 3 : 1, 3 - IMDM 1 : 1 : 3, 4 - IMDM $\frac{1}{3}$: 1 : 1, 5 - IMDM 1 : $\frac{1}{3}$: 1, 6 - IMDM 1 : 1 : $\frac{1}{3}$, 7 - IMDM 1 : 1 : 1, 8 - IMDM 3 : 3 : 3, 9 - IMDM $\frac{1}{3}$: $\frac{1}{3}$: $\frac{1}{3}$, 10 - IMDM+ITS 3 : 3 : 3, 11 - IMDM+ITS 1 : 1 : 1

Наиболее высокие концентрации мАт при культивировании были получены в среде IMDM, содержащей однократную и трехкратную концентрацию рекомбинантных белков неживотного происхождения. Для дальнейших исследований применяли среду, с однократным содержанием белковых компонентов, как в комплексной добавке ITS. Вместе со средой IMDM применяли белки неживотного происхождения и низкомолекулярные компоненты инсулин, трансферрин, ЧСА и селенит натрия, описанные выше.

4.14 Получение и применение гидролизатов

Для получения гидролизата растительные белки экстрагировали из порошков пшеницы, подсолнечника, гороха, риса, рисовой муки и сои. После экстракции белков проводили их количественную (Таблица 8) и качественную характеристику (Рисунок 31).

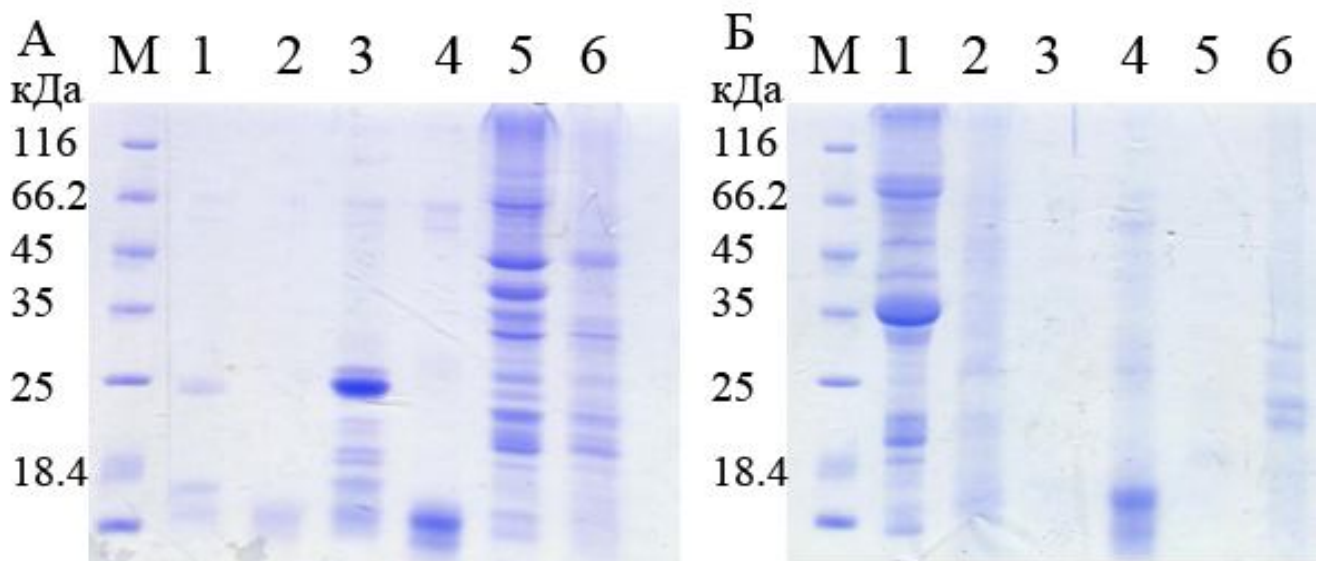


Рисунок 31. Электрофореграммы водных экстрактов растительных белков риса (А, 1-4) и гороха (А, 5 и 6) до (1, 3 и 5) и после 2, 4 и 6) гидролиза папаином; а также соевых белков (Б, 1 и 2), глютена (Б, 3 и 4) и подсолнуха (Б, 5 и 6)

М – белки-маркеры молекулярной массы (сверху вниз): β -галактозидаза (116.0), бычий сывороточный альбумин (66.2), овальбумин (45.0), лактатдегидрогеназа (35.0), РЕаза Vsp98I (25.0), β -лактоглобулин (18.4), лизоцим (14.4).

Таблица 8. Содержание растительного белка после гидролиза папаином

Источник растительного белка	Экстрагированный белок, мг/%	Масса осадка, мг	Белок после гидролиза, мг	Количество образующихся пептидов, мг/%	Концентрация пептидов, мг/мл*
Рисовый	14,0/1,4	1,0	4,3	8,7/62	0,22
Рисовой муки	2,9/0,36	0,8	1,6	0,54/18,6	0,014
Гороха	75,4/18,6	42,0	9,1	24,3/32	0,6
Сои	35,9/3,6	18,0	8,1	9,8/27	0,24
Пшеницы	23,8/2,9	9,7	6,5	7,6/32	0,19
Подсолнечника	55,3/6,8	16,6	10,1	28,6/52	0,7

Необходимо отметить, что при экстракции буфером подбирали такое количество порошка, чтобы в растворе концентрация экстрагируемого белка составляла 1 мг/мл. После гидролиза папаином растительных белков рН реакционной смеси доводили до 7,2 и центрифугировали, а в дальнейшем использовали надосадочную жидкость. Затем надосадочную жидкость пропускали через ячейку с мембраной для отделения молекул с молекулярной массой выше 5 кДа, что позволяло в дальнейшем исключить попадание в среды белков, не прогидролизированных папаином, и других высокомолекулярных соединений.

После проведения гидролиза растительных белков был получен набор пептидов (гидролизат). На **Рисунке 31** представлена их электрофореграмма до и после гидролиза папаином. По результатам качественного контроля (**Рисунок 31**) было установлено, что белки из порошка риса и рисовой муки с молекулярной массой 25 кДа полностью гидролизировались до фрагментов с молекулярной массой 14,4 кДа. Белки гороха гидролизировались равномерно, при этом полностью исчезали только белки с молекулярными массами 66, 40 и 35 кДа. Белки, экстрагированные из порошков сои, глютена и подсолнечника расщеплялись полностью. Для точного расчета прогидролизованного белка (пептиды) осадок,

полученный после гидролиза, подсушивали при 65°C, взвешивали и вычитали из количества первоначально экстрагированного белка. Белок, полученный при концентрировании на мембране, исключаящей пептиды с молекулярными массами ниже 5 кДа (белок после гидролиза, **Таблица 8**), также вычитали из количества первоначально экстрагированного белка. Белок, который составил разницу в результате вычитания осадка и пептидов с молекулярной массой более 5 кДа, был отнесен к низкомолекулярным пептидам и аминокислотам (гидролизат), которые использовали в качестве добавок при изучении их влияния на пролиферативную активность клеток-продуцентов.

Результаты проведения гидролиза белков папаином представлены на **Рисунке 32**. Конечная концентрация пептидов гидролизата не нормировалась по массе и концентрации, однако для гидролиза были взяты одинаковые количества исходных белков. Полученные результаты следовало, в первую очередь, нормировать по максимальной растворимости порошков растительного происхождения и эффективности гидролиза исходных белков (получения пептидов). Получение более высоких конечных концентраций гидролизатов требуют доработки методики гидролиза и проведения дополнительных изысканий в этой области.

Для исследования факторов, влияющих на продуктивность линии-продуцента (выход целевого продукта в среду культивирования), были использованы гидролизаты белков риса, рисовой муки, гороха, сои, пшеницы, подсолнечника и дрожжевого экстракта. Каждый из этих гидролизатов добавляли до 10% в среду культивирования, содержащую 3×10^5 клеток/мл. В качестве отрицательного контроля вместо гидролизата добавляли буфер, в котором растворяли гидролизаты. Усредненные результаты трёх независимых экспериментов представлены на **Рисунке 32**.

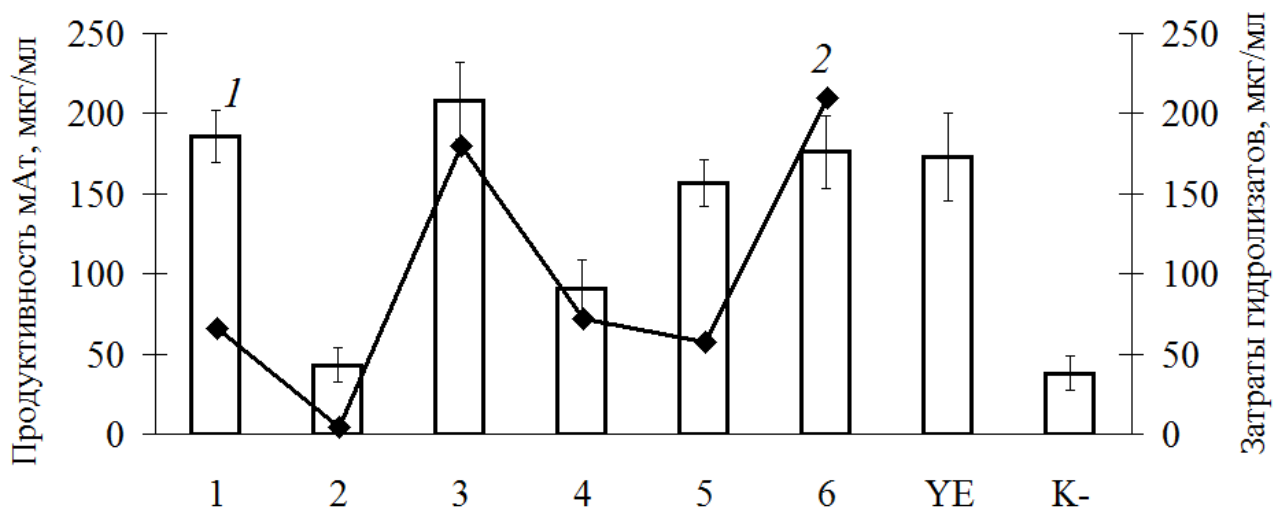


Рисунок 32. Продуктивность линии клеток (1, мАт мкг/мл среды) при внесении гидролизатов неживотного происхождения (2, мкг/мл) (увеличение продуктивности культуры при внесении гидролизатов в среды культивирования по отношению к содержанию в них пептидов)

1 – рисовый белок, 2 – белок рисовой муки, 3 – белок гороха, 4 – белок сои, 5 – белок пшеницы, 6 – белок подсолнечника К – контроль без внесения растворов гидролизатов, с внесением буфера гидролизатов, YE – внесение дрожжевого экстракта в объёме равном 10% объёма культуральной среды.

Применение гидролизатов рисового белка, а также белков гороха и подсолнечника оказалось наиболее эффективным. Такую эффективность трёх гидролизатов, содержащих набор пептидов с молекулярной массой не более 5 кДа, можно было объяснить, с одной стороны, присутствием входящих в их состав аминокислот, витаминов и жирных кислот, а с другой - использованными концентрациями. Однако исходя из полученных результатов, не было очевидно, что увеличение конечной концентрации мАт после культивирования клеток линии-продуцента связано с количеством внесенных гидролизатов. Так, наивысший уровень экспрессии рекомбинантных антител в среде IMDM с добавлением белковых и небелковых компонентов в количестве, указанном в **Таблице 7**, наблюдался также при добавлении в среду гидролизата белков гороха,

содержащих 180 мкг пептидов, который стимулировал продуцирование 208,4 мкг/мл мАт (конечная концентрация). Это соответствовало потреблению ~0,86 мкг пептидов/мкг целевого белка в 1 мл. Вторая наиболее продуктивная комбинация культура-продуцент-гидролизат была отмечена при использовании гидролизата рисового белка, содержащего 66 мкг пептидов, при которой продукция мАт в конечной концентрации составила 185 мкг/мл среды, что указывало на конверсию 0,36 мкг пептидов/мкг белка в 1 мл среды культивирования. Третья продуктивная культура содержала гидролизат белков подсолнечника. В этом случае при внесении 210 мкг пептидов продуктивность составила 176 мкг/мл, а конверсия составляла 1,193 мкг пептидов/мкг белка в 1 мл среды. Приведенные данные не позволили сделать однозначный вывод о том, что увеличение количества гидролизата влияло на уровень продукции мАт, экспрессируемых в среду культивирования. Однако можно предположить, что большое значение имели природа и источник гидролизатов. Применение дрожжевого экстракта в качестве контроля позволило сравнить эффективность внесения в среду культивирования гидролизатов, полученных из растительных источников, ранее широко используемых в качестве источников питательных веществ и аминокислот. Следует отметить, что применение дрожжевого экстракта при культивировании клеток для получения специфической продукции линии невозможно без дополнительных исследований безопасности, поскольку он в отличие от гидролизатов растительных белков может содержать и вредные не идентифицированные компоненты различной природы, изучение которых не входило в цели данной работы.

Таким образом, были разработаны как эффективные комбинации рекомбинантных белков-добавок, так и технология получения и применения гидролизатов неживотного происхождения для создания на основе среды IMDM бессывороточной среды культивирования. Совместное применение разработанных добавок или компонентов позволило получить среду для

выращивания и эффективной экспрессии целевого белка, рекомбинантного иммуноглобулина. Предложенный метод оптимизации среды культивирования может оказаться эффективным и для получения других рекомбинантных белков.

Комбинация белков-добавок, входящая в состав разработанной среды, позволила повысить продуктивность стабильной культуры-продуцента рекомбинантных химеризованных антител на основе клеток линии CHO на 44% по сравнению с используемой комплексной коммерческой добавкой ITS (Insulin-transferrin-selenium). Внесение в измененную среду IMDM гидролизатов белков гороха и риса, содержащих пептиды с молекулярной массой ниже 5 кДа, способствовало увеличению продуктивности линии в 3,9 и 4,5 раза, соответственно.

4.15 Культивирование для получения продукта и введение подпитки культуры

После выделения клона линии CHO S3-2F11 для изучения ростовых характеристик и возможности применения линии, полученной из клона 2F11 для получения продукции рекомбинантных антител в препаративных количествах, было проведено культивирование с применением полной ростовой среды OptiCHO. Было осуществлено сравнительное культивирование данной линии с применением подпитки и без применения подпитки. Для проведения культивирования применяли среду OptiCHO с добавлением 8 мМ L-глутамин. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера объёмом 125 мл. Стартовый объём культуры равнялся 20 мл. Подпитку производили, начиная с четвёртого дня культивирования каждый день в течение 4 дней. Внесение дополнительных порций питательных веществ и регуляторов клеточного цикла в среду культивирования позволило добиться повышения концентрации продуцируемого антитела на финальной стадии культивирования. В результате проведения подкормки культуры и сравнения продуктивностей культур, получавших и не получавших подкормку в ходе выращивания для получения продукции, удалось

установить, что полученная культура может быть использована для биотехнологических нужд при получении белкового продукта в больших количествах. Культура, получавшая подпитку с применением коммерческого препарата Cell Boost 7, увеличила свою продуктивность в ходе культивирования в 3,6 раза (**Рисунок 33**). По сравнению с культурами, полученными другими авторами, было показано, что подобная реакция обуславливается возможностями культуры адекватно воспринимать питательные вещества из среды, а также то, что для данной культуры возможен подбор оптимальных условий культивирования для увеличения продукции. Также подобное свидетельствует о сбалансированности метаболизма для продукции целевого белка культур в течение продолжительного времени без замены среды и отсутствия накопления токсических метаболитов в среде культивирования.

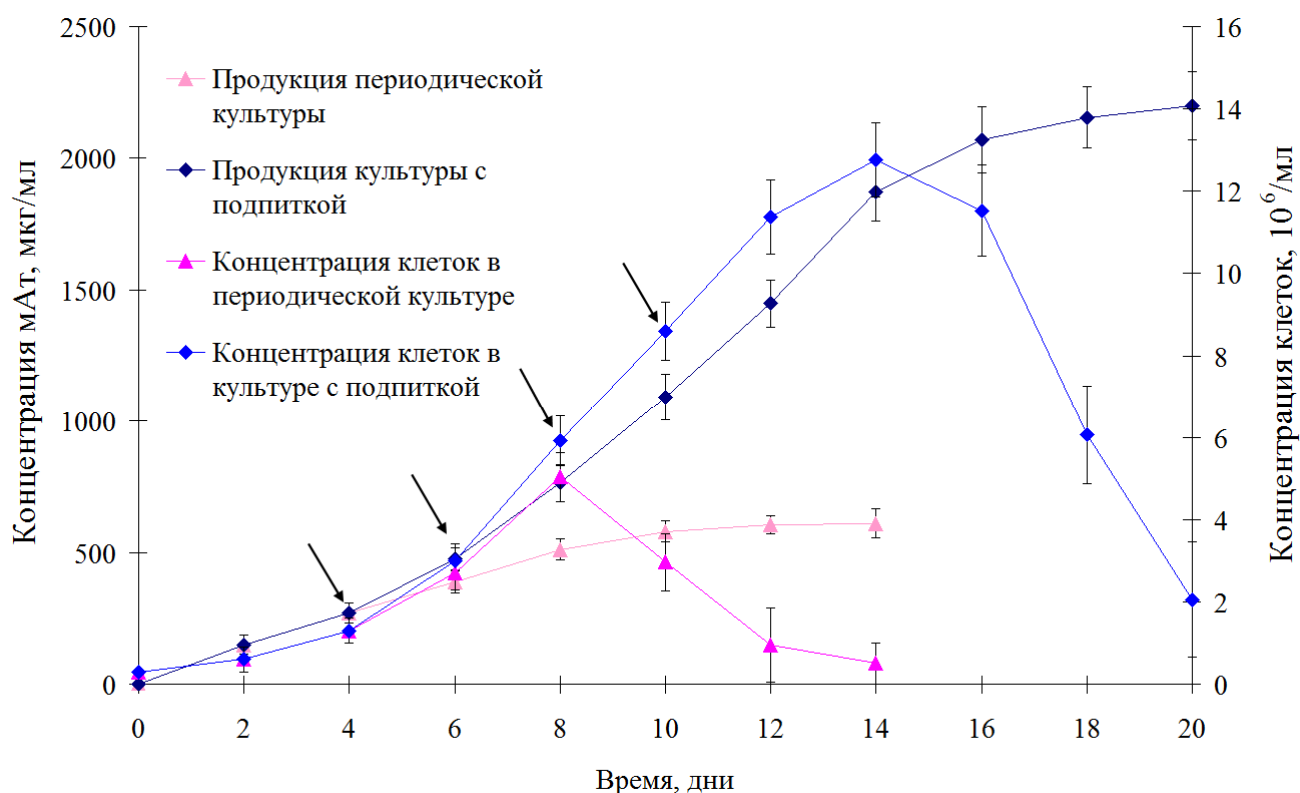


Рисунок 33. Сравнительное культивирование линии CHO S3-2F11 с применением подпитки и без применения подпитки культуры

Стрелками показаны дни внесения подпитывающего раствора в культуральный флакон.

5 Обсуждение результатов

Так как основной целью данной работы являлось исследование способов повышения продуктивности биосинтеза антител в клеточных линиях на основе CHO DG44, дефицитной по гену дигидрофолатредуктазы *dhfr*, с применением двух групп экспрессионных плазмид, а также усовершенствованных методик культивирования были решены такие задачи, как разработка бипромоторной экспрессионной конструкции, сравнение продуктивности биосинтеза антител на основе биплазмидной и бипромоторной конструкций в клетках CHO DG44 и осуществление нового подхода к селекции клонов-продуцентов, разработка эффективной методики культивирования стабильных продуцентов рекомбинантного антитела, а также оптимизирован состав бессывороточной среды с применением добавок на основе рекомбинантных белков и гидролизатов белков неживотного происхождения и реализована стратегия *fed-batch* культивирования.

5.1 Микрокапсулирование

Проведено сравнение нескольких методов инокулирования клеточной биомассы при суспензионном культивировании клеток CHO DG44, продуцирующих рекомбинантные антитела к ФНО-а. Показано, что метод культивирования с низкой плотностью посева способствует достижению наибольшего уровня биосинтеза антител. Предложена альтернатива культивированию клеток в суспензии, которая представляет собой культивирование клеток в гидрогелевых микрогранулах на основе альгината кальция или в альгинат-олигохитозановых полупроницаемых микрокапсулах, мембрана которых позволяет антителам проходить через мембрану и накапливаться в культуральной среде. Показано, что уровень продукции антител клетками CHO DG44, включенными в полимерные микрокапсулы, превышала

уровень продукции белка при суспензионном режиме культивирования в любом из его видов.

5.2 Цитосортировка

Флуоресцентно-активированная сортировка клеток (FACS), магнитные бусины и аналогичные методы позволяют идентифицировать и/или селективно обогатить культуру клеток на основании принципа присутствия и количеств поверхностных белков. Таким образом, технологии, которые приводят окрашиванию клеточной поверхности за счёт наличия на ней продуцируемого белка, пригодны для радикального увеличения эффективности скрининга путем селективного обогащения культуры за счёт высокопродуктивных клеток до клонирования. Также после селективного отбора возможно повторное обогащение культур с применением метода FACS [157]. Кроме того, были разработаны некоторые процедуры окрашивания, которые позволяют окрашивать поверхность клеток секретиремым продуктом без фиксации [7, 77, 103, 155]. В данной работе разработана система отбора, основанная на векторах pсDNA 3.3, pOptiVEC, pBiPr и полученные на их основе линии S3 и S11, которые могут быть обогащены с созданием популяций, имеющих значительно большую продуктивность в отношении целевого белка. В осуществленном подходе не применялся репортерный ген GFP, так как его наличие означает введение дополнительной стадии очистки препарата рекомбинантного антитела и последующую стадию проверки чистоты препарата на содержание остаточных количеств белка GFP в препаратах.

Ранее Sleiman и др. (2008) [158] разработали эффективный двойной внутриклеточный аутофлуоресцентный белок, связанный с FACS, для отбора клеток, продуцирующих антитела, с высоким уровнем обеих цепей антител [159]. В этой системе два репортера, GFP и YFP, применяются для тяжелой и легкой цепи, соответственно. В общем случае для точного анализа необходима правильная компенсация, когда в проточной цитометрии используется более двух

цветов [160]. Более того, аналогичный уровень интенсивности флуоресценции в GFP и YFP не гарантирует аналогичного уровня экспрессии тяжелой цепи и легкой цепи, потому что интенсивность флуоресценции является относительной величиной, а не абсолютной величиной. Кроме того, метод разделения клеток на основе вторичных антител GFP не выгоден тем, что один репортер вводится для количественного анализа. Применение вторичных антител к целевому продукту стабильной клеточной линии возможно также в двух вариантах - для тяжёлой и лёгкой цепей антитела отдельно. Однако, это нецелесообразно, так как продуктивность клеточной линии может быть легко оценена по относительному количеству тяжёлых цепей антитела, которые не могут быть обнаружены вне клетки, будучи не связанными с комплементарными лёгкими цепями антитела. Линия клеток, полученная в ходе детекции клонов, показывающих высокую активность по связыванию вторичных антител, имеет достоверно более высокую продуктивность в отношении целевого белка. При этом не содержит посторонних репортерных белков или довесков к продуцируемым белкам.

Генетическая нестабильность продуцирующей антитела клеточной линии СНО во время длительной культуры при отсутствии избирательного давления остаётся одной из основных проблем в культивировании клеток СНО [161].

5.3 Разные комбинации экспрессионных плазмид

Предложенный в работе способ селекции клонов-продуцентов, основанный на использовании флуоресцентно-меченых вторичных антител и автоматизированного анализа уровня биосинтеза, дает возможность в короткие сроки при меньшей концентрации селективных агентов произвести отбор клонов-суперпродуцентов рекомбинантных антител. Использование небольших концентраций селективных агентов позволяет предположить возможность дальнейших повторных клонирований и дальнейшего роста продукции субклонов.

Нами было показано, что продукция рекомбинантных антител в среде клетками линии CHO DG44 зависит от цис-конфигурации регуляторного элемента *dhfr*, включённого в состав плазмид, несущих вставки лёгкой и тяжёлой цепей рекомбинантного антитела против ФНО-а человека. Из двух плазмид, кодирующих пару цепей для последующей сборки полноразмерного антитела вектор pcDNA3.3 несёт ген устойчивости к селективному агенту G418, а OptiVEC, в свою очередь, к MTX. Необъяснимым остаётся факт снижения продуктивности культуры S1 при превышении концентрации MTX свыше предела в 250 нМ. В данной культуре экспрессия гена тяжёлой цепи находится под контролем селективного маркера *dhfr*, ответственного за устойчивость к MTX. По всей вероятности, в данном случае амплификация генов тяжёлой цепи антитела способствует увеличению продукции последней. Так как в нормально собранном антителе цепи лёгкой и тяжёлой цепей антитела находятся в эквимольном соотношении, может происходить неправильная сборка антител, что приводит к цитотоксичности и выбиванию из популяции наиболее эффективных продуцентов тяжёлой цепи и снижению продукции культуры в целом. Ранее было показано, что продукция рекомбинантных антител в клетках линии CHO в эквимольных концентрациях не является оптимальным выбором [17]. В приведённом исследовании утверждается, что наиболее оптимальным соотношением генов лёгкой и тяжёлой цепей при внесении в культуру клеток является 2:1 – 5:1. Наши эксперименты подтверждают это и демонстрируют, что слишком низкий уровень продукции тяжёлой цепи также лимитирует продукцию рекомбинантных антител. Некоторые другие авторы также рассматривали проблему влияния соотношения лёгкой и тяжёлой цепей антитела на правильность структуры рекомбинантных антител [17, 49, 162]. Li и др. [49] демонстрирует использование би-цистронных конструкций, включающих участок внутренней посадки рибосомы вируса энцефаломиокардита для экспрессии полноразмерных антител, и приходит к выводу, что превалирование молярных концентраций генов тяжёлой цепи над

генами лёгкой цепи значительно увеличивает уровень экспрессии функциональных антител в клетках линии НЕК293Т. Мы определили, что это не так для клеток линии СНО, в которых превалирование внутриклеточной экспрессии тяжёлой цепи над экспрессией лёгкой снижает продукцию рекомбинантных антител в среде культивирования. Напротив, было продемонстрировано, что коммерческая стабильная линия, полученная Biogen Idec (США) на основе линии клеток СНО, продуцирует в 1,4–2 раза больше тяжёлой цепи по отношению к лёгкой цепи. В своей работе авторы показали, что экспрессия тяжёлой цепи антитела является лимитирующим фактором в продукции рекомбинантных антител [66]. Также проблема оптимальных пропорций молярных соотношений генов лёгкой и тяжёлой цепей антитела поднимается в работе [163], в которой проведено сравнение двойных и одинарных экспрессионных векторов с открытой рамкой считывания. Исследованные вектора для экспрессии содержат гены лёгкой и тяжёлой цепей антитела вместе и порознь в разных конструкциях. Анализ продукции клеточных линий, полученных с применением векторов, объединяющих гены лёгкой и тяжёлой цепей антитела, показывает, что подобные линии имеют сниженную продукцию антител. Свободная тяжёлая цепь антитела не экспрессируется в среде культивирования. Все представленные тяжёлые цепи антитела включены в состав молекул иммуноглобулинов [164]. Таким образом, превалирование или несогласованная экспрессия тяжёлой цепи антитела в каждой клетке культуры-продуцента является токсичной для культуры и снижает скорость удвоения популяции, а также может приводить к клеточной гибели. Важной составляющей при получении стабильной клеточной линии-продуцента является соблюдение пропорций генов лёгкой и тяжёлой цепей антитела, встраиваемых клеткой в последовательность геном с целью получения оптимальной удваивающейся и продуцирующей культуры эукариотических клеток. Данные результаты демонстрируют, что для каждой из клеточных линий следует проводить

предварительную работу для выявления лучшего сочетания молярных соотношений генов лёгкой и тяжёлой цепей.

Линия S3, в которой экспрессия гена лёгкой цепи антитела производилась под контролем селективного маркера *dhfr*, была использована для изучения влияния высоких концентраций МТХ на продукцию рекомбинантных антител.

Повышение концентрации селективного агента МТХ в среде культивирования и проведение продолжительной полной селекции с применением данной концентрации показало, что продукция рекомбинантных антител в среду культивирования может быть увеличена в 1,4 раза. Эти данные согласуются с данными иностранных исследователей [165], по которым увеличение концентрации селективного агента МТХ с 50 нМ до 3000 нМ в потомках стабильно экспрессирующей культуры позволило добиться увеличения продукции рекомбинантного антитела в 2,2–2,5 раз. В нашем случае увеличение концентрации МТХ более 1000 нМ без применения дополнительных мер приводило к клеточной гибели и уменьшению продукции антител в среду культивирования. По нашим данным, при увеличении концентрации селективного агента МТХ до 1000 нМ (без дополнительного увеличения концентрации селективного агента G418) в среде сохраняется высокий уровень гетерогенности по уровню продукции полипептида тяжёлой цепи антитела. Полученные данные позволяют предположить, что подобное увеличение продукции тяжёлой цепи в клетках линии СНО S3 позволяет выделить группу клонов, высокий уровень продукции тяжёлой цепи в которых в полной мере скомпенсирован уровнем продукции лёгкой цепи, за счет чего может быть достигнут более высокий уровень культуры, полученной из группы клонов, удовлетворяющих данным критериям. Для проведения выделения группы клонов, экспрессирующих повышенные количества рекомбинантных антител в среду культивирования, наиболее часто применяется метод лимитирующего разведения. Как альтернативный метод может быть применен метод FACS (fluorescence-activated cell sorting) или проточная цитометрия для выбора группы клонов, обладающих

совокупным уровнем продукции целевого антитела, в количествах значительно превосходящих таковой для исходной гетерогенной популяции. Zuberbuchler и др. описал методику окраски стабильно продуцирующих антитела клеток линии СНО с применением вторичных антител, меченых флуоресцином изотиоцианатом [166]. Авторы публикации объясняют вероятность окраски клеточной культуры данным вторичным антителом «антителами, проходящими сквозь мембрану в стабильно трансфицированных клетках», что вполне вероятно. Наши исследования подтверждают данные полученные Zuberbuhler и др. в части процентного содержания окрашенных клеток и в части, касающейся прямой связи между уровнем окраски культуры клеток и уровнем продукции дочерней культуры, полученной из выделенной популяции. Тем не менее, мы показали, что обогащение культуры путем сортировки клеток имеет ограниченную пропускную способность за счет экспрессии в основном лёгкой цепи на поверхности клеток, в то время как экспрессия тяжёлой цепи является более важным для продуктивности клеток. Полученные нами данные о влиянии сортировки клеток показали, что второй и третий цикл селекции без применения дополнительных мер не приводит к дальнейшему увеличению выхода антител. Подобные результаты были опубликованы в работе Pichler и соавторов [167]. В своём исследовании Pichler и соавторы проводили клеточную сортировку линии клеток СНО-К1, транзистно экспрессирующую человеческое антитело. Цитосортировка в описанной работе производилась трижды и одним раундом лимитирующего разведения и выбора индивидуальных клонов культуры. Продукция в результате сортировки дочерних культур была сходной с родительской до этапа проведения клонального анализа культуры. По результатам лимитирующего разведения 3 из 16 клонов имели уровень продукции целевого белка выше уровня родительской культуры в 2–3 раза.

Известно, что продукция рекомбинантных антител в среде, не содержащей сыворотки предпочтительна, но малоэффективна [168]. Для сохранения преимуществ использования среды без добавления компонентов животного

происхождения можно применять препараты гидролизатов дрожжей, сои, пшеничного глютена или риса как высокоэффективных и недорогих добавок к питательной среде [147]. Было показано положительное влияние данных гидролизатов на продукцию тромбопоэтина человека в клетках CHO [169]. По нашим данным внесение в среду культивирования раствора дрожжевого экстракта повышает продукцию целевого рекомбинантного антитела в среду культивирования, в то время как внесение дополнительных количеств глюкозы в виде водного раствора не оказывает положительного влияния на уровень продукции культуры.

Выведение стабильных культур-продуцентов рекомбинантных антител требует много времени, трудозатрат и дорогостояще. В проделанной работе мы показали, что применение методики отбора группы клонов повышает вероятность благоприятного исхода в поиске высокопродуктивных стабильных клонов культуры продуцента на основе клеток линии CHO DG44. Несмотря на расхождения во мнениях относительно оптимального соотношения между внутриклеточным лёгкими и тяжёлыми цепями антитела, являющегося оптимальной для получения белка, полученные нами результаты показали, что лёгкая цепь экспрессируется обильно всеми клетками, в то время как синтез Н-цепи является ограничивающим фактором. Дальнейшие попытки клонировать клетки S3 методом лимитирующего разведения представят больше информации об оптимальном балансе генов лёгкой и тяжёлой цепей антитела в клетках CHO.

5.4 Параметры автоматизированного отбора колоний

Автоматическая система отбора колоний эукариотических клеток ClonePIX FL позволяет анализировать пул рассеянных клеток и отбирать претендентов для последующего выращивания.

Для этих целей клетки рассеивают в полутвёрдую среду, в которой присутствуют все необходимые для роста клеток компоненты. Также в состав

среды входят антитела к продукту, который вырабатывается клетками. К этим антителам должны быть ковалентно пришиты флуоресцирующие молекулы (FITC, GFP, RFP или другие). В случае если клетки стабильно трансфицированы плазмидой, кодирующей лёгкую и тяжёлую цепи антител, такими антитела будут вторичные антитела к тяжёлой цепи антитела, продуцируемого клетками.

После проведения анализа появляется возможность выбора группы клеток для отбора с помощью автоматизированной системы отбора клонов кандидатов в суперпродуценты. Для этого выбираются параметры, по которым будет производиться отбор клеток и определение их жизнеспособности, а также скорости и качества продукции требуемых исследователям белков среду культивирования. Физические характеристики колоний оценивались по следующим параметрам: размер, форма и расположение колоний относительно друг друга и краёв культурального планшета. Таким образом отсеиваются клоны, заведомо не подходящие для дальнейших манипуляций. Как только было получено изображение одной чашки или целой стопки чашек, и все колонии были автоматически детектированы, были заданы параметры в таблице Группы.

Задание правильных значений параметров отбора (в особенности — характеристики формы колоний), уменьшает вероятность несоблюдения клональности. Варьирование параметров дает возможность учитывать также динамику роста выбранных клеточных линий. На следующей стадии самым важным критерием является эффективность продукции клетками целевого белка, о которой можно достоверно судить правильным образом задав параметры оценки интенсивности флуоресценции и размеров колоний. Гистограммы и графики разброса программа составляет по данным, полученным при анализе всей популяции, что помогает установить параметры группы отбора и включить/исключить определенные типы колоний.

Задание параметров для анализа колоний в видимом диапазоне спектра осуществляется по следующим ключевым атрибутам:

1) *too big* (слишком крупные колонии).

Этот параметр исключает выбор нежелательных объектов, например, пузырьков воздуха или крупных колоний (скорее всего их большой пролиферативный потенциал не позволит им быть высокоэффективными продуцентами). Рекомендуется ставить значение этого параметра отбора больше $0,7 \text{ мм}^2$.

2) *too small* (слишком маленькие колонии).

Рекомендуемая минимальная площадь колонии, учитываемая при отборе, - $0,1 \text{ мм}^2$, но допускается и снижение до $0,05 \text{ мм}^2$ или даже $0,03 \text{ мм}^2$, но с некоторой потерей времени на ожидание дальнейшего роста таких колоний. Более низкие пределы дадут низкую результативность роста, поскольку ограниченное число колоний вряд ли выживет при низкой плотности посева. Очень малая площадь колонии также может указывать на низкий пролиферативный потенциал клона.

3) *Irregular 1 — Compactness* (компактность)

За единицу компактности принимается колония правильной круглой формы. Если периметр колонии в 2 раза превышает периметр идеально круглой колонии примерно такого же диаметра, то параметр компактности составляет 0,5, и т.д.

4) *Irregular 2 — Axis Ratio* (вытянутость)

При определении значения этого параметра для вытянутых колоний учитывается соотношение поперечной и продольной осей. Идеально круглая по форме колония имеет показатель 1. Колония с самой короткой осью, которая в 2 раза меньше самой длинной оси, имеет показатель 0,5 и т.д.

В обоих случаях были выбраны показатели равные 0,7 или больше, отобранные в таком случае колонии имеют округлую форму, что характеризует или моноклональные.

5) *Proximity* (расстояние между колониями)

Этот фактор учитывает то, насколько близко относительно друг друга расположены колонии. 1 мм (около 30 пикселей) считается безопасным расстоянием для отбора колоний. Однако, этот параметр был уменьшен до 0,5 мм, так как дальнейшие последующие клонирования культуры и проверка стабильности выделенных клонов позволяют исключить возможность ведения немоноклональной культуры.

После негативного отбора по приведённым параметрам клетки были отобраны в единую группу, из которой, в дальнейшем, отбирались по параметрам, определяемым при освещении в FITC-канале. Время экспозиции во всех случаях составляло 500 мс.

В планшеты под номерами 1 и 2 в каждом из приведённых клонирований отбирались колонии, имеющие наиболее высокие значения параметра среднего значения внешней интенсивности в ФИТЦ-канале ([FITC] Exterior Mean Intensity). Данные колонии являются вариантами колоний с самой высокой абсолютной продуктивностью. При использовании данного параметра для ранжирования колоний можно отметить, что в выборку в первую очередь попадают самые крупные колонии, которые в абсолютном выражении будут продуцировать больше иммуноглобулинов в среду культивирования. Две процедуры уточнений критериев отбора помогли избавиться от больших колоний, снизив ценз максимально больших колоний с $0,7 \text{ мм}^2$ до $0,3 \text{ мм}^2$, затем до $0,2 \text{ мм}^2$. Уменьшение максимального размера от $0,3 \text{ мм}^2$ до $0,2 \text{ мм}^2$ значительно улучшило выявление высокопродуктивных клонов, доказав, что с установлением этого показателя колонии, размеры которых были менее $0,1 \text{ мм}^2$, не отличались высокой продуктивностью.

Таким образом, стало возможным внести в группу для выделения клоны, имеющие небольшие размеры, однако в абсолютном выражении производящие сходные количества антител. Высокие показатели продуктивности колоний часто не соответствуют интенсивному росту этих клеток, т.к. высокоэффективные

продуценты зачастую испытывают нехватку ресурсов для поддержания интенсивного роста, в то время как колонии с высоким пролиферативным потенциалом, наоборот, не могут стать высокопродуктивными.

В планшеты 3 и 4 были отобраны колонии, лидирующие по значению параметра нормированной интенсивности (Normalised Intensity). Данный параметр рассчитывается по данным суммарной общей интенсивности (Sum Total Intensity) с поправкой на размер колонии. Нормированная интенсивность (Normalised Intensity) - параметр который лучше характеризует самые маленькие колонии, которые, возможно, в дальнейшем проявят себя как медленнорастущие. Параметр нормированной интенсивности (Normalised Intensity) был лучшим из всех параметров отбора, когда размеры отбираемых колоний не были ниже определенного минимума, позволявшего считать их рост достаточным для дальнейшей работы с ними.

В планшеты под номерами 5 и 6 производился отбор клонов с применением параметра суммарной общей интенсивности (Sum Total Intensity). Этот критерий включает общее полное испускание флуоресценции колонией и всего пространства, непосредственно ее окружающего.

Предполагается, что суммарная общая интенсивность (Sum Total Intensity) — более слабый критерий отбора по сравнению со средним внешней интенсивности (Exterior Mean Intensity), поскольку большие по размеру колонии могут испускать флуоресценцию такой же интенсивности, как и маленькие колонии, но будут котируются выше, поскольку размер колонии не учитывается. Следовательно, при наличии в популяции высокопродуктивных клонов небольшого размера при отборе главным параметром стоит выбирать среднее внешней интенсивности (Exterior Mean Intensity). Параметр среднего внутренней интенсивности (Interior Mean Intensity) был разработан, главным образом, для измерения интенсивности флуоресценции окружения колоний, например, при экспрессии клетками GFP или для пробной детекции поверхностных белков. Таким образом, этот фактор не принимает во внимание секреторную

составляющую, и преждевременно ожидать, что она легко предсказуема, даже в случаях, когда секреция очевидна.

Приведённые данные дают представление о том, как проверить и подобрать наиболее действенные параметры для отбора лучших клонов из клеточных линий в условиях рабочего эксперимента. Работа с любой клеточной линией предполагает, что для успешного отбора необходимо принимать во внимание локализацию флуоресцентного сигнала, а также те характеристики, которые могут предсказать высокую продуктивность колоний. Внутриклеточная или поверхностная флуоресценция надёжно регистрируется при использовании параметра среднего внутренней интенсивности (Interior Mean Intensity). Использование параметра суммарной общей интенсивности (Sum Total Intensity) позволяет эффективно произвести отбор клеток гибридом при больших фоновых помехах — наличии других клеток, экспрессирующих IgG.

5.5 Клональный анализ культур клеток

При клональном анализе культур клеток, предварительно прошедших один или несколько этапов селекции с применением селективных агентов по предложенной программе, возможно выделение группы высокопродуцирующих клонов в виде групп клеток, стабильно сохраняющих продуктивность в отношении целевого антитела, как в случае с культурой S3, так и в случае с культурой S11. Для стабильного роста продуктивности культур клеток при данном подходе необходимо увеличивать концентрации всех селективных агентов для существенного увеличения продуктивности культур, получаемых на основе культуры клеток CHO DG44. Такой подход становится достижим лишь при использовании комбинации пары плазмидных конструкций, каждая из которых несёт ген лёгкой или тяжёлой цепи под контролем соответствующего селективного маркера. Чередование этапов селекции с применением

повышающихся концентраций селективного агента МТХ и клонирования с применением робота-сортировщика эукариотических колоний позволяет с высокой вероятностью отобрать клоны, наиболее стабильные по уровню экспрессии. Ранжирование клонов после прохождения процедуры отбора и исследование параметров каждой из полученных культур клеток даёт возможность найти подходящего кандидата на роль линии продуцента рекомбинантного антитела к ФНО-а человека.

5.6 Сравнение эффективности стратегий отбора

В результате отбора клонов из каждого 6-луночного планшета, содержащего клетки, растущие в полутвердой среде культивирования с добавлением меченных вторичных антител, было отобрано 160 клонов по каждому из параметров. Выставленные параметры отбора отличались между собой в достаточной мере для различия в результатах продуктивности полученных клонов. В дальнейшем, данные клоны подвергали многостадийному анализу и отбору для выявления факторов, препятствующих получению стабильной культуры продуцента. Среди таких факторов — наличие в лунке более одной шаровидной колонии, относительно низкая скорость роста, относительно низкая продуктивность. Успешно прошедшие данный анализ клоны были в дальнейшем использованы для получения суспензионных культур и продолжали рост в небольших объёмах среды для тестирования продуктивности и наблюдения за стабильностью уровня экспрессии антител в среде культивирования.

Для проведения сравнения выбирали для обеих культур (S3, S11 и их производных) одинаковое количество клонов, прошедших отбор до суспензионного роста в 6-луночных планшетах (**Таблица 9**).

Таблица 9. Количество клонов и эффективность стратегии отбора по категориям

Наименование родительской культуры	Минимальное количество клонов	Количество клонов для стратегии 1	Количество клонов для стратегии 2	Количество клонов для стратегии 3
S3	9	3	4	2
S11	9	3	3	3
2A4	8	1	3	4
2F8	8	2	1	4
5G4	9	7	2	0
4C7	9	4	3	2
2H2	12	6	2	4
1C8	12	3	2	7
Итого, S3	38	17	11	10
Итого, S11	38	12	9	16

Под стратегией отбора 1 понимается значение External Mean Intensity, рассчитанное по FITC каналу. Под стратегией 2 — Normalized Intensity, под стратегией 3 — Sum Total Intensity. Время экспозиции доминирующей длиной волны для канала 500 миллисекунд.

В ходе анализа данных из **Рисунка 28** (Сводные данные клонов культур S3 и S11, **Таблица 9**) можно заключить, что вероятность нахождения наиболее высоко экспрессивных клонов среди отобранных для культуры S3 и её производных выше при использовании стратегии отбора 1. Для культуры S11 для культуры S11 и её производных, таковой является стратегия 3. Это можно объяснить разницей в распределении векторов в культуре S11 и её производных, где соотношение цепей детерминировано строением исходных плазмидных

конструкций и зависимой амплификацией генов лёгкой и тяжёлой цепей антитела.

Авторы публикации [170] отмечают, что при отмене селективного давления в своих клеточных пулах на основе клеток СНО, экспрессирующих целевое антитело под контролем различных промоторов, через 18 недель промотор клеток СНЕF сохранил 35% от уровня экспрессии мАт, в то время как клетки, имеющие CMV-промотор, постепенно теряли свою экспрессию и сохраняли только 10% их экспрессии мАт. Снижение экспрессии мАт через промотор CMV с течением времени может быть вызвано сайленсингом промотора [171, 172] из-за метилирования ДНК [84, 173] или потерей активации модификаций гистонов [174-176]. Таким образом, культура S11, в которой экспрессия гена лёгкой цепи непосредственно связана с экспрессией гена *dhfr* на первых этапах культивирования и отбора получила преимущество в скорости роста относительно культуры S3 и её производных. В ходе дальнейшего культивирования, селекции и отбора часть промоторов CMV, возможно, была инактивирована в большей степени, чем промоторы EF-1a. Так как экспрессия тяжёлой цепи находится под контролем EF-1a, который инактивировался меньше, клеточная линия S11 и её производные не показывали относительно более высокой продукции антител в среду культивирования в результате токсического влияния тяжёлой цепи на жизнеспособность и продукцию антител иммуноглобулинов [164]. Таким образом, клетки линии S11 и её производные, будучи высеянными на полутвёрдую среду культивирования без добавления селективных агентов, единственным доступным селективным фактором остаётся наличие гена *dhfr* в составе плазмидной конструкции, экспрессирующейся в них. В результате этого диспропорционально снижается активность промотора CMV и возникает цитотоксический эффект тяжёлой цепи антитела, который выражается в снижении скорости роста высокопродуктивных колоний с частичным разрушением клеток колонии клона [16].

5.7 Введение/разработка метода подкормки культуры

Для обеспечения роста клеточной массы и непрерывной продукции рекомбинантных антител стабильной клеточной линией-продуцентом необходимо поддерживать полный состав всех необходимых культуре питательных веществ в среде культивирования. Частота продуцирования белков в клетках линии СНО не изменяется значительно в расчёте на одну клетку культуры вне зависимости от концентрации клеточной массы. Таким образом, поддержание культуры в состоянии высокой плотности позволяет достигать больших концентраций рекомбинантного антитела в среде культивирования при незначительном увеличении времени проведения наработки целевого белка. Для рекомбинантных антител, продуцируемых для нужд биофармацевтической промышленности характерны концентрации биопрепарата равные 4–15 мг/мл [177, 178]. Таким образом, накопление продукта в культуральной среде не влечёт за собой его агрегацию или другие модификации, способные уменьшить его биологическую активность и повлиять на качество конечного препарата.

Внесение дополнительных порций питательных веществ способно значительно снизить себестоимость готового препарата, так как использование добавки для культивирования CellBoost 7 и других простых питательных веществ значительно выгоднее полной замены коммерческой среды на свежую.

В зависимости от производителя и состава коммерческие добавки инсулина и трансферрина обозначают *insulin-trasferrin-selenium-ethanolamine* (ITSE), *selenium-insulin-transferrin-ethanolamine* (SITE), *insulin-trasferrin-selenium-sodium pyruvate* (ITS-A), *insulin-trasferrin-selenium- ethanolamine*(ITS-G) или *insulin-trasferrin-selenium* (ITS). Другие их различия включают сведения, является ли продукт рекомбинантным, не содержащим животных экстрактов, или полученным из тканей животных, или донорской крови. Большинство продуктов, называемых на рынке инсулин-трансферрин-селенит натрия, содержат белки, полученные из крови, включающие бычий трансферрин или трансферрин из

плазмы человека, а также свиной инсулин. Однако существует несколько композиций рекомбинантных инсулина и трансферрина, полностью не содержащих животных добавок, которые предлагают компании «InVitria» и «Thermo Fisher Scientific» (США). Остальные композиции содержат нативные белки и не свободны от продуктов животного происхождения [138]. Их цена, часто основанная на стоимости других составляющих, может различаться. Разработка концентрата, состоящего из растворов белков, имеющих рекомбинантную природу и структуру, полностью сходную с белками человека, позволила добиться высокого уровня безопасности. Следует отметить, что при терапии препаратами, полученными на основе бессывороточных сред с рекомбинантными белками-добавками, исключается вероятность заражения больного вирусами животных. В свою очередь замена коммерческой среды позволила снизить затраты на получение целевого IgG1 линией-производителем, и таким образом снизить себестоимость фармацевтических препаратов, получаемых в результате биосинтеза в клеточных линиях-производителях.

В работе показано, что гидролизаты дрожжей способствуют приросту продуктивности клеток линии СНО в культуре, что соответствует ряду других исследований, которые подтверждают способность таких гидролизатов увеличивать плотность клеток СНО в процессе культивирования и специфическую продуктивность их линий [142, 143, 179].

При выборе источника сырья широко используются гидролизаты растений и дрожжей, поскольку они исключают применение в биофармацевтике в качестве добавок в среду культивирования продуктов животного происхождения [144-146]. Было показано, что источник этих гидролизатов влиял на рост клеток и продукцию ими целевого белка [147]. Известен также ряд коммерческих добавок, включающих гидролизаты растительного происхождения. Данные добавки являются комплексными, однако состав таких композиций относится к коммерческой тайне.

Разработанная в ходе выполнения данной работы рекомбинантная низкобелковая среда на основе комбинация белков-добавок позволила повысить продуктивность стабильной культуры-продуцента рекомбинантных химеризованных антител на основе клеток линии CHO на 44% по сравнению с используемой комплексной коммерческой добавкой ITS (Insulin-transferrin-selenium). Внесение в разработанную среду на основе IMDM гидролизатов белков гороха и риса, содержащих пептиды с молекулярной массой ниже 5 кДа, позволило увеличить продуктивность линии на основе клеток CHO в 3.9 и 4.5 раза, соответственно.

5.8 Оценка экономической эффективности производства подкормки

Проведение подкормки культуры из расчёта 1000 мл на культивирование требует внесения 120 мл раствора компонента Cell Boost 7a и 12 мл раствора компонента Cell Boost 7b к одному литру среды культивирования OptiCHO. Таким образом, в случае применения растворов для подкормки культуры возможно пренебречь затратами среды на транспирацию и принять финальный объём среды равным одному литру. При отсутствии подкормки затраты на транспирацию необходимо компенсировать регулярным внесением буферного раствора. Для достижения равной подкормки при применении только среды OptiCHO необходимо 3000 мл данной среды, а также проведения 3 одновременных или последовательных культивирований, что увеличивает финальную стоимость затраченных компонентов (**Таблица 10**).

Таблица 10. Сравнение финансовых затрат на выращивание культуры для получения белкового продукта в виде рекомбинантных антител к ФНО-альфа

Среда	Стоимость фасовки, руб.*	Объём фасовки, мл	Объём использования, мл	Затраты среды на 1 л, руб.	Общие затраты на культивирование, руб.
Invitrogen, OptiCHO, полная	197800	1000	3000	59399,7	59399,7
HyClone, Cell Boost 7a и 7b, концентраты	79200	5000	120	19799,9	21700,7

*В ценах декабря 2020 года

Исходя из данных, представленных в таблице выше, можно заключить, что использование комплексной добавки является более предпочтительным, так как затраты на получение белкового продукта в среде объёмом 3000 мл без применения добавки в сравнении с объёмом 1000 мл при её применении уменьшаются на 63,5%. Также при применении подкормки в сравнении с культивированием при её отсутствии снижаются трудозатраты персонала пропорционально количеству культуральных сосудов для проведения культивирования. При невозможности проведения одновременного культивирования 3 культуральных сосудов ёмкостью 1000 мл каждый и возникающей необходимости проведения последовательных культивирований в одном сосуде ёмкостью 1000 мл также до трёх раз снижаются затраты на электроэнергию, расход углекислого газа и амортизирующие расходы на оборудование, связанные с хранением, пробоподготовкой и выделением целевого белкового продукта в виде рекомбинантных антител к ФНО-а человека.

6 Заключение

Терапевтические мАт уже давно являются важным классом белков для лечения широкого спектра заболеваний: бактериальных, вирусных, аутоиммунных. Оптимизация процессов селекции и культивирования клеток СНО-продуцентов терапевтических мАт способствует снижению себестоимости препаратов на их основе, что в конечном итоге приводит к увеличению их доступности и улучшению качества жизни больных.

В ходе выполнения работы был осуществлен сравнительный анализ 4 вариантов биплазмидных и бипромоторных конструкций для экспрессии химерного антитела к ФНО-а человека в клетках СНО. Были отобраны наиболее эффективные варианты для каждого типа экспрессионных конструкций, после чего были исследованы закономерности метотрексатной селекции и клонального отбора для полученных стабильных клеточных культур. Было установлено, что применение бипромоторных конструкций для экспрессии мАт к ФНО-а позволяет добиться больших уровней продуктивности в отношении целевого белка на этапе селекции клеточной линии при концентрации МТХ, не превышающей 500 нМ. Было показано, что после достижения предела, равного 250-500 нМ МТХ, до применения клонального отбора или цитосортировки для каждой из исследованных культур рост продуктивности мАт прекращается и начинает снижаться по мере дальнейшего увеличения концентрации МТХ. Данная особенность селекции может быть преодолена увеличением концентрации второго селективного агента при его наличии в составе экспрессионного вектора. При более высокой концентрации селективного агента оптимальным является использование биплазмидной конструкции, в том числе в сочетании с проведением цитосортировки родительской культуры. Было показано, что флуоресцентно-активированная сортировка клеток (FACS) позволяет идентифицировать и селективно обогатить культуру клеток на основании принципа присутствия и количеств поверхностных белков. Таким образом,

технологии, которые приводят к окрашиванию клеточной поверхности за счёт наличия на ней продуцируемого белка, пригодны для радикального увеличения эффективности скрининга путем селективного обогащения культуры за счёт высокопродуктивных клеток до клонирования.

Линия клеток, полученная в ходе детекции клонов, показывающих высокую активность по связыванию вторичных антител, имеет достоверно более высокую продуктивность в отношении целевого белка. При этом она не содержит посторонних репортерных белков или довесков к продуцируемым белкам.

Предложенный в работе способ селекции клонов-продуцентов, основанный на использовании флуоресцентно-меченых вторичных антител и автоматизированного анализа уровня биосинтеза, дает возможность в короткие сроки при меньшей концентрации селективных агентов произвести отбор клонов-суперпродуцентов рекомбинантных антител. Использование небольших концентраций селективных агентов позволяет предположить возможность дальнейших повторных клонирований и дальнейшего роста продукции субклонов.

Проведено сравнение нескольких методов инокулирования клеточной биомассы при суспензионном культивировании клеток CHO DG44, продуцирующих рекомбинантные антитела к ФНО-а. Показано, что метод культивирования с низкой плотностью посева способствует достижению наибольшего уровня биосинтеза антител.

Предложена альтернатива культивированию клеток в суспензии, которая представляет собой культивирование клеток в гидрогелевых микрогранулах на основе альгината кальция или в альгинат-олигохитозановых полупроницаемых микрокапсулах, мембрана которых позволяет антителам проходить через мембрану и накапливаться в культуральной среде. Показано, что уровень продукции антител клетками CHO DG44, включенными в полимерные микрокапсулы, превышал уровень продукции белка при суспензионном режиме культивирования в любом из его видов.

Была показана возможность оптимизации среды культивирования исключительно с применением белковых факторов неживотного происхождения и растительных гидролизатов. Разработанная в ходе выполнения данной работы рекомбинантная низкобелковая среда на основе комбинации белков-добавок позволила повысить продуктивность стабильной культуры-продуцента рекомбинантных химерных антител на основе клеток линии CHO на 44% по сравнению с используемой комплексной коммерческой добавкой ITS (Insulin-transferrin-selenium). Внесение в разработанную среду на основе IMDM гидролизатов белков гороха и риса, содержащих пептиды с молекулярной массой ниже 5 кДа, позволило увеличить продуктивность линии на основе клеток CHO в 3,9 и 4,5 раза, соответственно. Такая комбинация добавок в среду культивирования на основе базовой среды IMDM позволяет избежать контаминации конечного продукта культивирования в виде белкового препарата вирусами человека и другими болезнетворными агентами.

Все перечисленные результаты позволяют добиться значительного снижения себестоимости конечного препарата.

Выводы

1. Созданы две пары конструкций (биплазмидная и бипромоторная) для экспрессии химерных антител к фактору некроза опухоли-альфа в культуре эукариотических клеток СНО DG44, дефицитной по гену дигидрофолатредуктазы *dhfr*.
2. На основе созданных биплазмидных и бипромоторных конструкций получены линии клеток, стабильно экспрессирующие рекомбинантные антитела к фактору некроза опухоли-альфа, оптимизирована стратегия получения и культивирования стабильных продуцентов рекомбинантных антител.
3. Установлено, что на ранних этапах получения стабильной клеточной линии сравнимый уровень продуктивности культуры может быть достигнут при использовании как биплазмидной, так и бипромоторной систем экспрессии. Для достижения высокого уровня продуктивности при концентрации селективного агента метотрексата более 500 нМ оптимальным является использование биплазмидной конструкции, в том числе в сочетании с проведением цитосортировки родительской культуры и клонального отбора.
4. Добавление рекомбинантных белков инсулина, трансферрина и человеческого сывороточного альбумина позволило повысить продуктивность стабильной культуры-продуцента рекомбинантных антител на основе клеток линии СНО на 44% по сравнению с используемой комплексной коммерческой добавкой ITS.
5. Внесение в разработанную среду гидролизатов белков гороха и риса, содержащих пептиды с молекулярной массой ниже 5 кДа, позволило увеличить продуктивность линии на основе клеток СНО в 3,9 и 4,5 раза, соответственно.

7 Список использованной литературы:

1. <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/antibodies-market>.
2. Jayapal, K.P., et al., *Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting*. Chemical Engineering Progress, 2007. **103**(10): p. 40-47.
3. Kim, J.Y., Y.G. Kim, and G.M. Lee, *CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential*. Appl Microbiol Biotechnol, 2012. **93**(3): p. 917-30.
4. Kunert, R., et al., *Stable recombinant expression of the anti HIV-1 monoclonal antibody 2F5 after IgG3/IgG1 subclass switch in CHO cells*. Biotechnology and Bioengineering, 2000. **67**(1): p. 97-103.
5. Radko, B.V., et al., *Characterization of the genes encoding variable light and heavy chains of the high-affinity monoclonal antibody against human tumor necrosis factor*. Russ J Immunol, 2002. **7**(4): p. 371-4.
6. listed, N.a., *Etanercept and infliximab for rheumatoid arthritis*. Drug Ther Bull, 2001. **39**(7): p. 49-52.
7. Carroll, S. and M. Al-Rubeai, *The selection of high-producing cell lines using flow cytometry and cell sorting*. Expert Opinion on Biological Therapy, 2004. **4**(11): p. 1821-1829.
8. Brezinsky, S.C.G., et al., *A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity*. Journal of Immunological Methods, 2003. **277**(1-2): p. 141-155.
9. Yoshikawa, T., et al., *Flow cytometry: An improved method for the selection of highly productive gene-amplified CHO cells using flow cytometry*. Biotechnology and Bioengineering, 2001. **74**(5): p. 435-442.
10. Serpieri, F., et al., *Comparison of Humanized IgG and FvFc Anti-CD3 Monoclonal Antibodies Expressed in CHO Cells*. Molecular Biotechnology, 2010. **45**(3): p. 218-225.
11. Reinhart, D., et al., *Benchmarking of commercially available CHO cell culture media for antibody production*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015. **99**(11): p. 4645-4657.
12. Liste-Calleja, L., M. Lecina, and J.J. Cairó, *HEK293 cell culture media study: increasing cell density for different bioprocess applications*. BMC Proceedings, 2013. **7**(Suppl 6): p. P51-P51.
13. Utsumi, J., et al., *Characterization of four different mammalian-cell-derived recombinant human interferon-beta 1s. Identical polypeptides and non-identical carbohydrate moieties compared to natural ones*. Eur J Biochem, 1989. **181**(3): p. 545-53.
14. Baldi, L., et al., *Transient gene expression in suspension HEK-293 cells: application to large-scale protein production*. Biotechnol Prog, 2005. **21**(1): p. 148-53.

15. Khoo, S.H. and M. Al-Rubeai, *Detailed understanding of enhanced specific antibody productivity in NS0 myeloma cells*. Biotechnol Bioeng, 2009. **102**(1): p. 188-99.
16. Kohler, G., *Immunoglobulin chain loss in hybridoma lines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(4): p. 2197-9.
17. Schlatter, S., et al., *On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells*. Biotechnol Prog, 2005. **21**(1): p. 122-33.
18. Xin, X., et al., *Roles of tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms, tumor necrosis factor alpha level in aqueous humor, and the risks of open angle glaucoma: A meta-analysis*. Molecular Vision, 2013. **19**: p. 526-535.
19. Bodmer, J.L., P. Schneider, and J. Tschopp, *The molecular architecture of the TNF superfamily*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(1): p. 19-26.
20. Dejana, E., W. Ji-Ming, and A. Mantovani, *The recruitment of leukocytes and their interaction with the vessel wall: the role of interleukin-1 and tumor necrosis factor*. Scand J Rheumatol Suppl, 1987. **66**: p. 19-25.
21. Murray, J., et al., *Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro*. Blood, 1997. **90**(7): p. 2772-83.
22. Bradley, J.R., *TNF-mediated inflammatory disease*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 149-60.
23. Hehlhans, T. and K. Pfeffer, *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. Immunology, 2005. **115**(1): p. 1-20.
24. Devin, A., et al., *The alpha and beta subunits of IkappaB kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(12): p. 3986-94.
25. Degterev, A., et al., *Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins*. Nat Chem Biol, 2008. **4**(5): p. 313-21.
26. Davis, R., et al., *TNF-alpha-mediated proliferation of vascular smooth muscle cells involves Raf-1-mediated inactivation of Rb and transcription of E2F1-regulated genes*. Cell Cycle, 2012. **11**(1): p. 109-18.
27. Noti, M., et al., *TNF suppresses acute intestinal inflammation by inducing local glucocorticoid synthesis*. J Exp Med, 2010. **207**(5): p. 1057-66.
28. Bernardino, L., et al., *Tumor necrosis factor-alpha modulates survival, proliferation, and neuronal differentiation in neonatal subventricular zone cell cultures*. Stem Cells, 2008. **26**(9): p. 2361-71.
29. Mukhopadhyay, A., et al., *Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines*. Oncogene, 2001. **20**(52): p. 7597-609.
30. Croft, M., *The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(4): p. 271-85.

31. Kosmac, M., et al., *Exploring the binding sites of anti-infliximab antibodies in pediatric patients with rheumatic diseases treated with infliximab*. *Pediatr Res*, 2011. **69**(3): p. 243-8.
32. A., S.J., et al., *2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis*. *Arthritis Care & Research*, 2016. **68**(1): p. 1-25.
33. Akinbosoye, O., O.S. Matlin, and L. Mostovoy, *Conventional and biologic rheumatoid arthritis therapies: Utilization and cost trends*. Vol. 4. 2012. 295-298.
34. Singh, J.A., et al., *2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis*. *Arthritis Rheumatol*, 2016. **68**(1): p. 1-26.
35. De Keyser, F., et al., *Ten-year followup of infliximab therapy in rheumatoid arthritis patients with severe, longstanding refractory disease: a cohort study*. *J Rheumatol*, 2014. **41**(7): p. 1276-81.
36. de Vlam, K., C. Boone, and A. The Prove Study Group, *Treatment adherence, efficacy, and safety of etanercept in patients with active psoriatic arthritis and peripheral involvement in Belgium for 66 months (PROVE study)*. *Clin Exp Rheumatol*, 2015. **33**(5): p. 624-31.
37. Wurm, F.M., *Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells*. *Nat Biotechnol*, 2004. **22**(11): p. 1393-8.
38. *Humira (adalimumab)*, *Abbvie Inc.* 2013. .
39. Keffer, J., et al., *Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis*. *EMBO J*, 1991. **10**(13): p. 4025-31.
40. Kempeni, J., *Preliminary results of early clinical trials with the fully human anti-TNFalpha monoclonal antibody D2E7*. *Ann Rheum Dis*, 1999. **58 Suppl 1**: p. I70-2.
41. Rau, R., *Adalimumab (a fully human anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) in the treatment of active rheumatoid arthritis: the initial results of five trials*. *Ann Rheum Dis*, 2002. **61 Suppl 2**: p. ii70-3.
42. Burmester, G.R., et al., *Safety and effectiveness of adalimumab in patients with rheumatoid arthritis over 5 years of therapy in a phase 3b and subsequent postmarketing observational study*. *Arthritis Res Ther*, 2014. **16**(1): p. R24.
43. Gordon, K., et al., *Long-term efficacy and safety of adalimumab in patients with moderate to severe psoriasis treated continuously over 3 years: results from an open-label extension study for patients from REVEAL*. *J Am Acad Dermatol*, 2012. **66**(2): p. 241-51.
44. Mease, P., et al., *Randomized controlled trial of adalimumab in patients with nonpsoriatic peripheral spondyloarthritis*. *Arthritis Rheumatol*, 2015. **67**(4): p. 914-23.
45. Reinisch, W., et al., *52-week efficacy of adalimumab in patients with moderately to severely active ulcerative colitis who failed corticosteroids and/or immunosuppressants*. *Inflamm Bowel Dis*, 2013. **19**(8): p. 1700-9.

46. Monaco, C., et al., *Anti-TNF therapy: past, present and future*. Int Immunol, 2015. **27**(1): p. 55-62.
47. Sizova, L.V., *Treatment of early arthritis using arthrofoon (ultra-low doses of antibodies to tumor necrosis factor-alpha)*. Indian J Pharmacol, 2011. **43**(6): p. 724-5.
48. Mounach, A., et al., *Stevens-Johnson syndrome complicating adalimumab therapy in rheumatoid arthritis disease*. Rheumatol Int, 2013. **33**(5): p. 1351-3.
49. Li, J.M., et al., [*Expression of human-mouse chimeric antibody directed against Chikungunya virus with site-specific integration system*]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2005. **21**(3): p. 312-5, 318.
50. Dwek, R.A., *Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars*. Chem Rev, 1996. **96**(2): p. 683-720.
51. Goochee, C.F. and T. Monica, *Environmental effects on protein glycosylation*. Biotechnology (N Y), 1990. **8**(5): p. 421-7.
52. Jenkins, N. and E.M. Curling, *Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects*. Enzyme Microb Technol, 1994. **16**(5): p. 354-64.
53. Gaillet, B., et al., *High-level recombinant protein production in CHO cells using an adenoviral vector and the cumate gene-switch*. Biotechnol Prog, 2007. **23**(1): p. 200-9.
54. Al-Ahwal, M.S., Y.H. Shafik, and H.M. Al-Ahwal, *First national survival data for colorectal cancer among Saudis between 1994 and 2004: what's next?* BMC Public Health, 2013. **13**: p. 73.
55. http://www.wcrf.org/cancer_stastics/.
56. Urlaub, G. and L.A. Chasin, *Isolation of Chinese-Hamster Cell Mutants Deficient in Dihydrofolate-Reductase Activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences, 1980. **77**(7): p. 4216-4220.
57. Bebbington, C.R., et al., *High-Level Expression of a Recombinant Antibody from Myeloma Cells Using a Glutamine-Synthetase Gene as an Amplifiable Selectable Marker*. Bio-Technology, 1992. **10**(2): p. 169-175.
58. Baldi, L., et al., *Transient gene expression in suspension HEK293 cells: Application to large-scale protein production*. Animal Cell Technology Meets Genomics, 2005: p. 365-367.
59. Pham, P.L., A. Kamen, and Y. Durocher, *Large-scale Transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein*. Molecular Biotechnology, 2006. **34**(2): p. 225-237.
60. Fallaux, F.J., et al., *New Helper Cells and Matched Early Region 1-Deleted Adenovirus Vectors Prevent Generation of Replication-Competent Adenoviruses*. Human Gene Therapy, 1998. **9**(13): p. 1909-1917.
61. Jones, D., et al., *High-Level Expression of Recombinant IgG in the Human Cell Line PER.C6*. Biotechnology Progress, 2003. **19**(1): p. 163-168.
62. Trill, J.J., A.R. Shatzman, and S. Ganguly, *Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells*. Curr Opin Biotechnol, 1995. **6**(5): p. 553-60.

63. Bianchi, A.A. and J.T. McGrew, *High-level expression of full-length antibodies using trans-complementing expression vectors*. Biotechnol Bioeng, 2003. **84**(4): p. 439-44.
64. Schutt, C., et al., *CHO transfectants produce large amounts of recombinant protein in suspension culture*. J Immunol Methods, 1997. **204**(1): p. 99-102.
65. Page, M.J. and M.A. Sydenham, *High level expression of the humanized monoclonal antibody Campath-1H in Chinese hamster ovary cells*. Biotechnology (N Y), 1991. **9**(1): p. 64-8.
66. Zhou, W., et al., *Fed-batch culture of recombinant NS0 myeloma cells with high monoclonal antibody production*. Biotechnol Bioeng, 1997. **55**(5): p. 783-92.
67. Barnes, L.M., C.M. Bentley, and A.J. Dickson, *Advances in animal cell recombinant protein production: GS-NS0 expression system*. Cytotechnology, 2000. **32**(2): p. 109-123.
68. Reinhart, D., et al., *Benchmarking of commercially available CHO cell culture media for antibody production*. Appl Microbiol Biotechnol, 2015. **99**(11): p. 4645-57.
69. Li, F., et al., *Cell culture processes for monoclonal antibody production*. MAbs, 2010. **2**(5): p. 466-79.
70. Lucas, B.K., et al., *High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(9): p. 1774-9.
71. Boshart, M., et al., *A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus*. Cell, 1985. **41**(2): p. 521-30.
72. Running Deer, J. and D.S. Allison, *High-level expression of proteins in mammalian cells using transcription regulatory sequences from the Chinese hamster EF-1alpha gene*. Biotechnol Prog, 2004. **20**(3): p. 880-9.
73. Kozak, M., *Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes*. Cell, 1986. **44**(2): p. 283-92.
74. Birch, J.R. and A.J. Racher, *Antibody production*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. **58**(5-6): p. 671-85.
75. Shen, A., et al., *Recombinant DNA technology and cell line development*. In: Ozturk SS, Hu W-S, editors. *Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies*. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2006: p. 15-40.
76. Nunberg, J.H., et al., *Amplified dihydrofolate reductase genes are localized to a homogeneously staining region of a single chromosome in a methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(11): p. 5553-6.
77. Borth, N., et al., *Efficient selection of high-producing subclones during gene amplification of recombinant Chinese hamster ovary cells by flow cytometry and cell sorting*. Biotechnol Bioeng, 2000. **71**(4): p. 266-73.
78. Boshart, M., et al., *A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus*. Cell, 1985. **41**(2): p. 521-530.

79. Chadd, H.E. and S.M. Chamow, *Therapeutic antibody expression technology*. Current Opinion in Biotechnology, 2001. **12**(2): p. 188-194.
80. Birch, J.R. and A.J. Racher, *Antibody production*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2006. **58**(5–6): p. 671-685.
81. Chen, C. and L.A. Chasin, *Cointegration of DNA molecules introduced into mammalian cells by electroporation*. Somat Cell Mol Genet, 1998. **24**(4): p. 249-56.
82. Bianchi, A.A. and J.T. McGrew, *High-level expression of full-length antibodies using trans-complementing expression vectors*. Biotechnology and Bioengineering, 2003. **84**(4): p. 439-444.
83. Andersen, C.R., et al., *Efficient expression from one CMV enhancer controlling two core promoters*. Mol Biotechnol, 2011. **48**(2): p. 128-37.
84. Yang, Y., et al., *DNA methylation contributes to loss in productivity of monoclonal antibody-producing CHO cell lines*. J Biotechnol, 2010. **147**(3-4): p. 180-5.
85. Khan, K.H., *Gene expression in Mammalian cells and its applications*. Adv Pharm Bull, 2013. **3**(2): p. 257-63.
86. Zhu, J., *Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production*. Biotechnol Adv, 2012. **30**(5): p. 1158-70.
87. Rita Costa, A., et al., *Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production*. Eur J Pharm Biopharm, 2010. **74**(2): p. 127-38.
88. Brooks, A.R., et al., *Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle*. J Gene Med, 2004. **6**(4): p. 395-404.
89. Andersen, C.R., et al., *Efficient Expression from One CMV Enhancer Controlling Two Core Promoters*. Molecular Biotechnology, 2011. **48**(2): p. 128-137.
90. Li, J., et al., *A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies*. Journal of Immunological Methods, 2007. **318**(1): p. 113-124.
91. Ho, S.C., et al., *Control of IgG LC:HC ratio in stably transfected CHO cells and study of the impact on expression, aggregation, glycosylation and conformational stability*. J Biotechnol, 2013. **165**(3-4): p. 157-66.
92. Chartrain, M. and L. Chu, *Development and production of commercial therapeutic monoclonal antibodies in Mammalian cell expression systems: an overview of the current upstream technologies*. Curr Pharm Biotechnol, 2008. **9**(6): p. 447-67.
93. Ho, S., Y. Wah Tong, and Y. Yang, *Generation of monoclonal antibody-producing mammalian cell lines*. Vol. 1. 2013. 71-87.
94. Martinez-Salas, E., *Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors*. Curr Opin Biotechnol, 1999. **10**(5): p. 458-64.
95. Mountford, P.S. and A.G. Smith, *Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis*. Trends Genet, 1995. **11**(5): p. 179-84.

96. Kaufman, R.J., et al., *Improved vectors for stable expression of foreign genes in mammalian cells by use of the untranslated leader sequence from EMC virus*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(16): p. 4485-90.
97. Wurm, F.M., *Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells*. Nat Biotech, 2004. **22**(11): p. 1393-1398.
98. Browne, S.M. and M. Al-Rubeai, *Selection methods for high-producing mammalian cell lines*. Trends in Biotechnology, 2007. **25**(9): p. 425-432.
99. Hacker, D.L., M. De Jesus, and F.M. Wurm, *25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells — Where do we go from here?* Biotechnology Advances, 2009. **27**(6): p. 1023-1027.
100. Nicole, B., Z. Max, and K. Hermann, *Efficient selection of high-producing subclones during gene amplification of recombinant Chinese hamster ovary cells by flow cytometry and cell sorting*. Biotechnology and Bioengineering, 2000. **71**(4): p. 266-273.
101. Caron, A.W., et al., *Fluorescent labeling in semi-solid medium for selection of mammalian cells secreting high-levels of recombinant proteins*. BMC Biotechnol, 2009. **9**: p. 42.
102. Pichler, J., et al., *A study on the temperature dependency and time course of the cold capture antibody secretion assay*. J Biotechnol, 2009. **141**(1-2): p. 80-3.
103. Brezinsky, S.C., et al., *A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity*. J Immunol Methods, 2003. **277**(1-2): p. 141-55.
104. Meilhoc, E., K.D. Wittrup, and J.E. Bailey, *Application of flow cytometric measurement of surface IgG in kinetic analysis of monoclonal antibody synthesis and secretion by murine hybridoma cells*. Journal of Immunological Methods, 1989. **121**(2): p. 167-174.
105. DeMaria, C.T., et al., *Accelerated clone selection for recombinant CHO cells using a FACS-based high-throughput screen*. Biotechnology Progress, 2007. **23**(2): p. 465-472.
106. Browne, S.M. and M. Al-Rubeai, *Selection methods for high-producing mammalian cell lines*. Trends in Biotechnology. **25**(9): p. 425-432.
107. Caron, A.W., et al., *Fluorescent labeling in semi-solid medium for selection of mammalian cells secreting high-levels of recombinant proteins*. BMC Biotechnology, 2009. **9**(1): p. 42.
108. Dharshanan, S. and C.S. Hung, *Screening and Subcloning of High Producer Transfectomas Using Semisolid Media and Automated Colony Picker*, in *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols*, V. Ossipow and N. Fischer, Editors. 2014, Humana Press: Totowa, NJ. p. 105-112.
109. Nakamura, T. and T. Omasa, *Optimization of cell line development in the GS-CHO expression system using a high-throughput, single cell-based clone selection system*. J Biosci Bioeng, 2015. **120**(3): p. 323-9.

110. Hou, J.J.C., et al., *High-throughput ClonePix FL analysis of mAb-expressing clones using the UCOE expression system*. New Biotechnology, 2014. **31**(3): p. 214-220.
111. Lim, F. and A.M. Sun, *Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas*. Science, 1980. **210**(4472): p. 908-10.
112. Murua, A., et al., *Cell microencapsulation technology: towards clinical application*. J Control Release, 2008. **132**(2): p. 76-83.
113. Fike, R., *Nutrient supplementation strategies for biopharmaceutical production, Part I: Identifying a nutrient supplementation formulation*. BioProcess Int, 2009. **7**(10): p. 44-51.
114. Xie, L. and D.I. Wang, *Fed-batch cultivation of animal cells using different medium design concepts and feeding strategies*. Biotechnology and bioengineering, 1994. **43**(11): p. 1175-1189.
115. Xie, L. and D.I. Wang, *Applications of improved stoichiometric model in medium design and fed-batch cultivation of animal cells in bioreactor*. Cytotechnology, 1994. **15**(1-3): p. 17-29.
116. Lopes, J.A., et al., *Chemometrics in bioprocess engineering: process analytical technology (PAT) applications*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2004. **74**(2): p. 269-275.
117. González-Leal, I., et al., *Use of a Plackett–Burman statistical design to determine the effect of selected amino acids on monoclonal antibody production in CHO cells*. Biotechnology progress, 2011. **27**(6): p. 1709-1717.
118. Wurm, F.M., *Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells*. Nature biotechnology, 2004. **22**(11): p. 1393-8.
119. Yoon, S.K., et al., *Adaptation of Chinese hamster ovary cells to low culture temperature: cell growth and recombinant protein production*. J Biotechnol, 2006. **122**(4): p. 463-72.
120. Yoon, S.K., J.Y. Song, and G.M. Lee, *Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells*. Biotechnol Bioeng, 2003. **82**.
121. Fox, S.R., et al., *Maximizing interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modeling*. Biotechnol Bioeng, 2004. **85**(2): p. 177-84.
122. Kim, D.Y., et al., *Effects of supplementation of various medium components on chinese hamster ovary cell cultures producing recombinant antibody*. Cytotechnology, 2005. **47**(1-3): p. 37-49.
123. Nienow, A.W., *Reactor Engineering in Large Scale Animal Cell Culture*. Cytotechnology, 2006. **50**(1): p. 9.
124. Arden, N. and M.J. Betenbaugh, *Regulating apoptosis in mammalian cell cultures*. Cytotechnology, 2006. **50**(1-3): p. 77-92.
125. Borys, M.C., D.I. Linzer, and E.T. Papoutsakis, *Culture pH affects expression rates and glycosylation of recombinant mouse placental lactogen proteins by Chinese hamster ovary (CHO) cells*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(6): p. 720-4.

126. Liu, C.H. and L.H. Chen, *Enhanced recombinant M-CSF production in CHO cells by glycerol addition: model and validation*. Cytotechnology, 2007. **54**(2): p. 89-96.
127. Ozturk, S.S. and B.O. Palsson, *Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 2. Effects of serum concentration, dissolved oxygen concentration, and medium pH in a batch reactor*. Biotechnol Prog, 1991. **7**(6): p. 481-94.
128. Furukawa, K. and K. Ohsuye, *Effect of culture temperature on a recombinant CHO cell line producing a C-terminal alpha-amidating enzyme*. Cytotechnology, 1998. **26**(2): p. 153-64.
129. Darfler, F.J., *A protein-free medium for the growth of hybridomas and other cells of the immune system*. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1990. **26**(8): p. 769-778.
130. Kan, M. and I. Yamane, *In vitro proliferation and lifespan of human diploid fibroblasts in serum-free BSA-containing medium*. J Cell Physiol, 1982. **111**(2): p. 155-62.
131. Guilbert, L.J. and N.N. Iscove, *Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures*. Nature, 1976. **263**(5578): p. 594-5.
132. Lambert, K. and J. Birch, *Cell growth media*. Animal cell biotechnology, 1985. **1**: p. 85-122.
133. Kawamoto, T., et al., *Development of a serum-free medium for growth of NS-1 mouse myeloma cells and its application to the isolation of NS-1 hybridomas*. Analytical biochemistry, 1983. **130**(2): p. 445-453.
134. Kovár, J., *Hybridoma cultivation in defined serum-free media: growth-supporting substances. IV. Lipids and serum albumin*. Folia biologica, 1987. **33**(6): p. 377-384.
135. Bretscher, M.S., *The molecules of the cell membrane*. Sci Am, 1985. **253**(4): p. 100-8.
136. Trowbridge, I.S. and M.B. Omary, *Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(5): p. 3039-43.
137. Iscove, N.N. and F. Melchers, *Complete replacement of serum by albumin, transferrin, and soybean lipid in cultures of lipopolysaccharide-reactive B lymphocytes*. J Exp Med, 1978. **147**(3): p. 923-33.
138. <https://cellculturedish.com/combining-insulin-and-transferrin-in-cell-culture-supplements/>.
139. Baré, G., et al., *Effects of a Rice Protein Hydrolysate on Growth of CHO Cells and Production of Human Interferon- γ in a Serum-Free Medium*, in *Animal Cell Technology: From Target to Market: Proceedings of the 17th ESACT Meeting Tylösand, Sweden, June 10–14, 2001*, E. Lindner-Olsson, N. Chatzissavidou, and E. Lüllau, Editors. 2001, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 217-219.

140. Mols, J., et al., *Origin of rice protein hydrolysates added to protein-free media alters secretion and extracellular proteolysis of recombinant interferon-gamma as well as CHO-320 cell growth*. *Biotechnol Lett*, 2004. **26**(13): p. 1043-6.
141. Mosser, D.D., et al., *Use of a dicistronic expression cassette encoding the green fluorescent protein for the screening and selection of cells expressing inducible gene products*. *Biotechniques*, 1997. **22**.
142. Richardson, J., et al., *Metabolomics analysis of soy hydrolysates for the identification of productivity markers of mammalian cells for manufacturing therapeutic proteins*. *Biotechnol Prog*, 2015. **31**(2): p. 522-31.
143. Gupta, A.J., et al., *Factors causing compositional changes in soy protein hydrolysates and effects on cell culture functionality*. *J Agric Food Chem*, 2013. **61**(45): p. 10613-25.
144. Donaldson, M.S. and M.L. Shuler, *Low-Cost Serum-Free Medium for the BTI-Tn5B1-4 Insect Cell Line*. *Biotechnology Progress*, 1998. **14**(4): p. 573-579.
145. Franěk, F., O. Hohenwarter, and H. Katinger, *Plant Protein Hydrolysates: Preparation of Defined Peptide Fractions Promoting Growth and Production in Animal Cells Cultures*. *Biotechnology Progress*, 2000. **16**(5): p. 688-692.
146. Heidemann, R., et al., *The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells*. *Cytotechnology*, 2000. **32**(2): p. 157-167.
147. Sung, Y.H., et al., *Yeast hydrolysate as a low-cost additive to serum-free medium for the production of human thrombopoietin in suspension cultures of Chinese hamster ovary cells*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004. **63**(5): p. 527-36.
148. Bartkowiak, A. and W. Brylak, *Hydrogel microcapsules containing natural and chemically modified oligochitosan - Mechanical properties and porosity*. *Polimery/Polymers*, 2006. **51**: p. 547-554.
149. Bobik, T.V., et al., *Production of Recombinant Human Transferrin in Eukaryotic Pichia pastoris Expression System*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2019. **167**(3): p. 335-338.
150. Gusarova, V., et al., *Size-exclusion chromatography based on silica-diol for the analysis of the proinsulin fusion protein*. *J Chromatogr A*, 2007. **1176**(1-2): p. 157-62.
151. Laemmli, U.K., *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
152. Weidle, U.H., et al., *Reconstitution of functionally active antibody directed against creatine kinase from separately expressed heavy and light chains in non-lymphoid cells*. *Gene*, 1987. **51**(1): p. 21-9.
153. Balabashin, D., et al., *Production of anti TNF-alpha antibodies in eukaryotic cells using different combinations of vectors carrying heavy and light chains*. *Cytotechnology*, 2014.
154. Omasa, T., *Gene amplification and its application in cell and tissue engineering*. *J Biosci Bioeng*, 2002. **94**(6): p. 600-5.

155. Cacciatore, J.J., L.A. Chasin, and E.F. Leonard, *Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system*. *Biotechnol Adv*, 2010. **28**(6): p. 673-81.
156. Bobik, T.V., et al., [*Expression of human serum albumin in metylotrophic yeast Pichia pastoris and its structural and functional analysis*]. *Bioorg Khim*, 2008. **34**(1): p. 56-62.
157. Manz, R., et al., *Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995. **92**(6): p. 1921-1925.
158. Sleiman, R.J., et al., *Accelerated cell line development using two-color fluorescence activated cell sorting to select highly expressing antibody-producing clones*. *Biotechnol Bioeng*, 2008. **99**(3): p. 578-87.
159. Yoshikawa, T., et al., *Flow cytometry: an improved method for the selection of highly productive gene-amplified CHO cells using flow cytometry*. *Biotechnol Bioeng*, 2001. **74**(5): p. 435-42.
160. Roederer, M., *Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats*. *Cytometry*, 2001. **45**(3): p. 194-205.
161. Kim, S.J., et al., *Characterization of chimeric antibody producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure*. *Biotechnol Bioeng*, 1998. **58**(1): p. 73-84.
162. Gomez, N., et al., *Culture temperature modulates aggregation of recombinant antibody in cho cells*. *Biotechnol Bioeng*, 2012. **109**(1): p. 125-36.
163. Davies, S.L., et al., *Impact of gene vector design on the control of recombinant monoclonal antibody production by Chinese hamster ovary cells*. *Biotechnol Prog*, 2011. **27**(6): p. 1689-99.
164. Morrison, S.L. and M.D. Scharff, *Heavy chain-producing variants of a mouse myeloma cell line*. *J Immunol*, 1975. **114**(2 Pt 1): p. 655-9.
165. Jiang, Z., Y. Huang, and S.T. Sharfstein, *Regulation of recombinant monoclonal antibody production in chinese hamster ovary cells: a comparative study of gene copy number, mRNA level, and protein expression*. *Biotechnol Prog*, 2006. **22**(1): p. 313-8.
166. Zuberbuhler, K., et al., *A general method for the selection of high-level scFv and IgG antibody expression by stably transfected mammalian cells*. *Protein Eng Des Sel*, 2009. **22**(3): p. 169-74.
167. Pichler, J., et al., *Selection of CHO host cell subclones with increased specific antibody production rates by repeated cycles of transient transfection and cell sorting*. *Biotechnol Bioeng*, 2011. **108**(2): p. 386-94.
168. Kim, D.Y., et al., *Development of serum-free media for a recombinant CHO cell line producing recombinant antibody*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006. **39**(3): p. 426-433.

169. Hu, S., et al., *Bioprocess development for the production of mouse-human chimeric anti-epidermal growth factor receptor vIII antibody C12 by suspension culture of recombinant Chinese hamster ovary cells*. Cytotechnology, 2011. **63**(3): p. 247-58.
170. Ebadat, S., et al., *Evaluating the efficiency of CHEF and CMV promoter with IRES and Furin/2A linker sequences for monoclonal antibody expression in CHO cells*. PLOS ONE, 2017. **12**(10): p. e0185967.
171. Strutzenberger, K., et al., *Changes during subclone development and ageing of human antibody-producing recombinant CHO cells*. J Biotechnol, 1999. **69**(2-3): p. 215-26.
172. Chusainow, J., et al., *A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: what makes a stable high producer?* Biotechnol Bioeng, 2009. **102**(4): p. 1182-96.
173. Osterlehner, A., S. Simmeth, and U. Gopfert, *Promoter methylation and transgene copy numbers predict unstable protein production in recombinant Chinese hamster ovary cell lines*. Biotechnol Bioeng, 2011. **108**(11): p. 2670-81.
174. Fadloun, A., et al., *Chromatin signatures and retrotransposon profiling in mouse embryos reveal regulation of LINE-1 by RNA*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(3): p. 332-8.
175. Chen, T. and S.Y. Dent, *Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(2): p. 93-106.
176. Bailey, L.A., et al., *Determination of Chinese hamster ovary cell line stability and recombinant antibody expression during long-term culture*. Biotechnol Bioeng, 2012. **109**(8): p. 2093-103.
177. Handlogten, M.W., et al., *Intracellular response to process optimization and impact on productivity and product aggregates for a high-titer CHO cell process*. Biotechnology and Bioengineering, 2018. **115**(1): p. 126-138.
178. Huang, Y.M., et al., *Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment*. Biotechnol Prog, 2010. **26**(5): p. 1400-10.
179. Mosser, M., et al., *Combination of yeast hydrolysates to improve CHO cell growth and IgG production*. Cytotechnology, 2013. **65**(4): p. 629-41.

8 Благодарности

Выражаю глубокую благодарность моим научным руководителям к.х.н. Алиеву Теймуру Кантамировичу и д.б.н. Долгих Дмитрию Александровичу за неоценимую помощь в выполнении данной работы, за важные практические рекомендации, поддержку и обсуждение результатов.

Автор выражает признательность сотрудникам отдела биоинженерии ИБХ РАН, соавторам и коллабораторам.

Автор благодарит В.А. Топорову (ИБХ РАН) за помощь в проведении молекулярно-биологических работ, к.б.н. Е.В. Свирщевскую за помощь в проведении культуральных работ и к.б.н. Е.Н. Калиберду за помощь в получении растительных гидролизатов.