

Балабашин Дмитрий Сергеевич

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССОВ СЕЛЕКЦИИ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК
ЛИНИИ СНО, ПРОДУЦИРУЮЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ
ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ-АЛЬФА ЧЕЛОВЕКА**

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена в лаборатории инженерии белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук.

Научные руководители:

*кандидат химических наук Алиев Теймур Кантамирович,
доктор биологических наук Долгих Дмитрий Александрович.*

Официальные оппоненты:

Шемякин Игорь Георгиевич, доктор химических наук, профессор, ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, руководитель лаборатории молекулярной биологии, заместитель директора по науке

Воробьева Надежда Евгеньевна, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, старший научный сотрудник, руководитель группы динамики транскрипционных комплексов

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН.

Защита состоится «19» мая 2022 года в 14.00 на заседании Диссертационного совета 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 года.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



А.Ф.Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

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 (факторов свертывания крови) 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 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.

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 транзientная экспрессия, экспрессия в стабильных клеточных линиях, трансдукция лентивирусными частицами и другие. Для нужд фармацевтики в 70% случаев используют клеточные линии СНО. Основным направлением можно считать продукцию в стабильных линиях. 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. Данное антитело имеет родство к фактору некроза опухоли-альфа человека (ФНО- α). Антитела против ФНО- α используются для терапии таких заболеваний, как ревматоидный артрит, псориаз, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит, болезнь Крона и других ФНО- α опосредованных заболеваний.

Для получения стабильной линии на основе иммортализованной линии клеток млекопитающих для продукции антител к ФНО- α 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, 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. Другим вариантом увеличения продуктивности культуры клеток, стабильно продуцирующих антитела в среду культивирования, является применение контролируемого культивирования в высокой плотности с дополнительным питанием культуры.

Цель и задачи исследования

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.

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 CHO DG44 и осуществление нового подхода к селекции клонов-продуцентов.
3. Разработка эффективной методики культивирования стабильных продуцентов рекомбинантного антитела на примере химерного 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. Проведено сравнение эффективности двух вариантов биплазмидной и двух вариантов бипромоторных экспрессионных конструкций, а также их сравнение между собой. Разработана эффективная методика культивирования стабильных продуцентов на примере продуцента химерного антитела F10 против фактора некроза опухоли-альфа человека.
3. Разработана бессывороточная среда культивирования на основе белков, полученных из неживотных источников.
4. Разработана эффективная схема подкормки культуры клеток-продуцентов на основе произведенного гидролизата белков неживотного происхождения.

Положения, выносимые на защиту

1. Создание двух групп генетических конструкций, содержащих гены легкой и тяжелой цепей антитела к ФНО- α с применением пары генетических маркеров в одном случае и единственного маркера в другом, позволяет сравнить эффективность экспрессии антитела к ФНО- α .
2. Разработана оптимальная стратегия селекции линий клеток, полученных с использованием двух групп векторных конструкций, и установлены максимальные концентрации селективных агентов, приводящие к увеличению продуктивности
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 изобретения. Кроме того, материалы и результаты диссертационной работы были представлены на 6 международных конференциях.

Структура и объём диссертации

Диссертация включает разделы: список сокращений, введение, обзор и анализ литературных источников по теме исследования, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, заключение, выводы, список использованной литературы, состоящий из 179 источников. Работа изложена на 145 страницах, содержит 33 рисунка и 10 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методология и методы диссертационного исследования

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

Результаты и их обсуждение

Получение экспрессионных плазмид, несущих гены цепей антитела F10

Для получения биплазмидной системы экспрессии в векторы pcDNA3.3 и pOptiVEC (Invitrogen, США) с помощью двух перекрывающихся синтетических олигонуклеотидов были введены сайты узнавания рестриктаз NheI и XhoI и отобраны клоны с правильной ориентацией фрагмента. Ранее из библиотеки кДНК, полученной на основе мРНК гибридомы, продуцирующей антитела к ФНО- α человека, были выделены и охарактеризованы клоны, содержащие гены варибельных доменов тяжелой и легкой цепей антитела к ФНО- α человека F10 (Radko, Voitchenko et al.).

Ген химерной легкой цепи антитела был получен в результате объединения кодирующих последовательностей мышинового варибельного и человеческого константного доменов методом SOE-PCR. Амплификация проводилась со специфическими олигонуклеотидными праймерами, с помощью которых на 5'-конец гена был введен сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции NheI, а на 3'-конец был введен сайт XhoI. После обработки PCR-фрагмента соответствующими рестриктазами ген химерной легкой цепи антитела клонировали в вектора pcDNA3.3 и pOptiVEC с введенными сайтами узнавания рестриктаз NheI и XhoI, и секвенировали в обоих направлениях по методу Сэнгера.

Таким образом, были получены следующие экспрессионные конструкции:

— плазмиды, несущие гены тяжелой и легкой цепей химерного антитела F10 против ФНО- α человека (**Рисунок 1А, Б**) отдельно, а именно, pcDNA3.3-LC, pcDNA3.3-HC, pOptiVEC-HC, pOptiVEC-LC.

— экспрессионные плазмиды pOptiVEC-EGFP и pcDNA3.3-mCherry, содержащие ген зеленого и красного флуоресцентных белков для контроля процессов трансфекции и селекции (**Рисунок 1В**);

Следующей задачей являлось получение бипромоторных экспрессионных плазмид, в которых гены обеих цепей антитела находятся в одной плазмиде. В такой конструкции транскрипция гена легкой цепи антитела осуществляется с CMV промотора, для транскрипции гена тяжелой цепи антитела был использован промотор EF-1 α . Были получены 2 варианта

бипромоторных плазмид, отличающиеся направлением транскрипции генов легкой и тяжелой цепей антитела (**Рисунок 1Г, Д**).

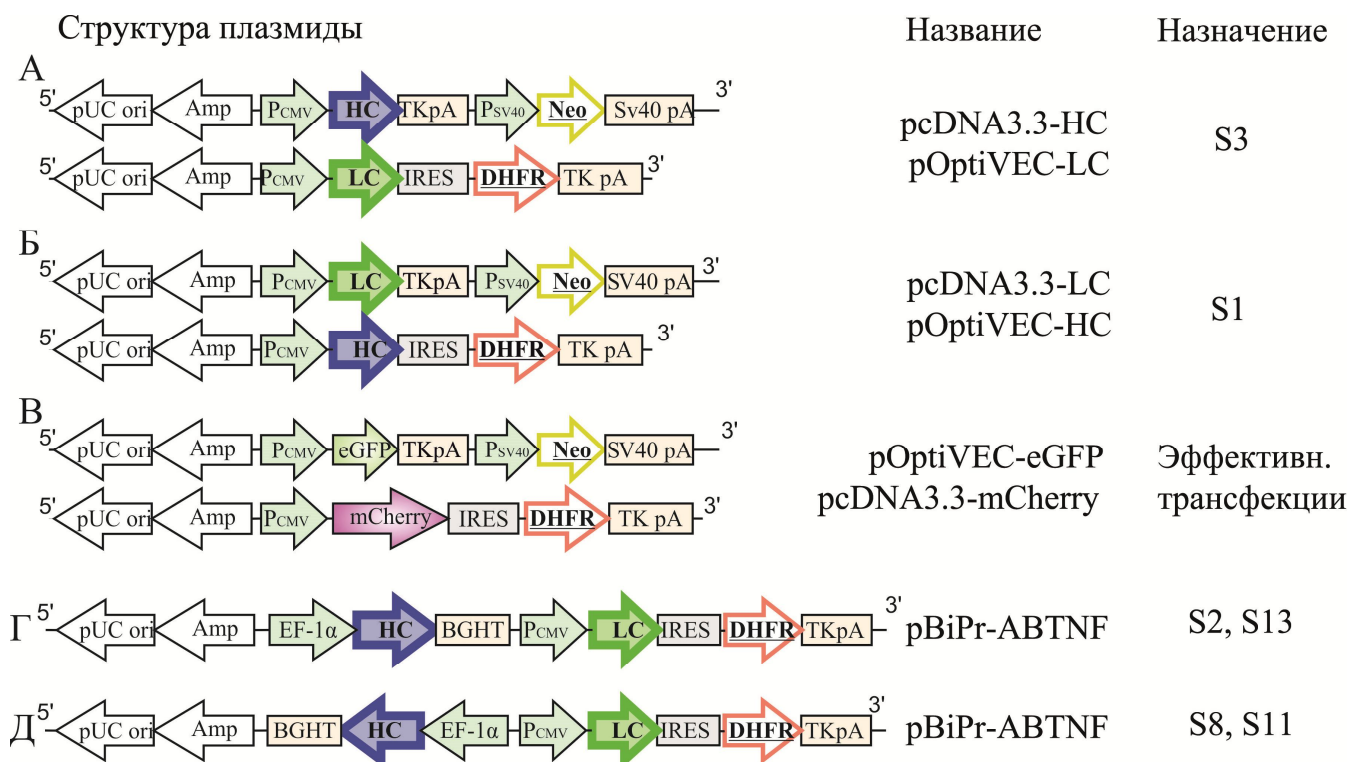


Рисунок 1. Структура плазмид для биплазмидной и бипромоторной экспрессии антитела к ФНО-а, и плазмид, несущих гены флуоресцентных белков

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

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

Сравнение культур клеток СНО, полученных на основе биплазмидной экспрессии

На основе пар плазмид А и Б (Рисунок 1) методом липофекции были получены две культуры (S3 и S1), проведена селекция 500 мкг/мл G418 и 250 нМ МТХ. Продуктивность полученной стабильной линии S3 превышает уровень продукции антител в линии S1 (Рисунок 2), что может свидетельствовать о целесообразности расположения гена легкой цепи в *cis*-ориентации по отношению к гену *dhfr* в составе экспрессионной плазмиды.

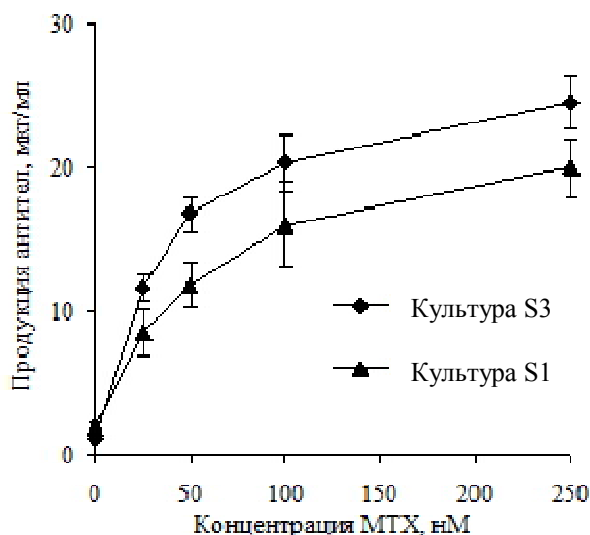


Рисунок 2. Продукция антител в клеточных линиях S1 и S3 в зависимости от концентрации метотрексата в среде культивирования

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

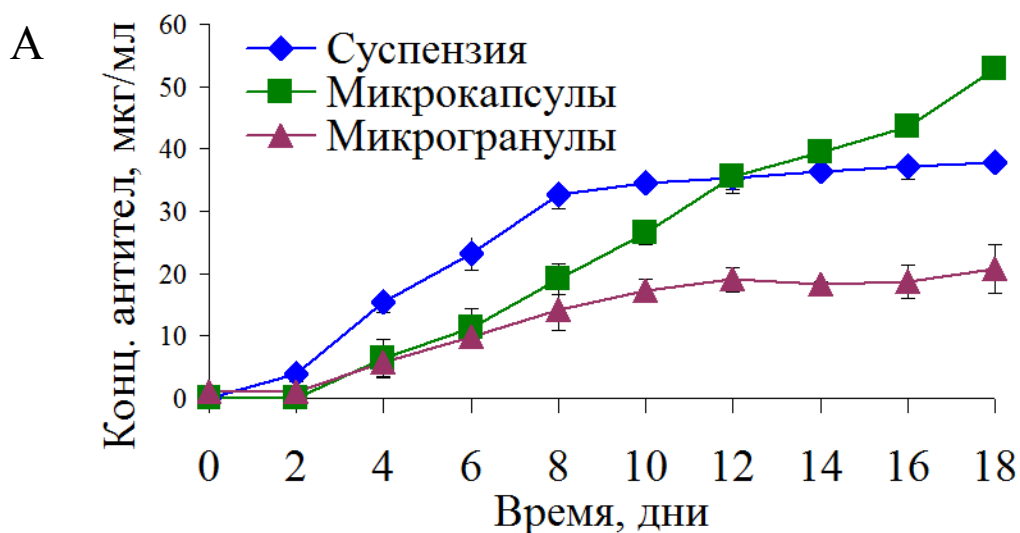
В рамках оптимизации лабораторной технологии культивирования клеточных линий в суспензии было исследовано влияние плотности клеточного инокулята и режима культивирования на уровень продукции антител. Антитело-продуцирующую линию S3-250нМ выращивали в присутствии 250 нМ МТХ и 500 мкг/мл G418 в качестве селектирующих агентов. С целью выяснения оптимального метода культивирования в суспензии были использованы три основных подхода, приведенные в Таблице 1.

Таблица 1. Уровень продукции антител при различных методах культивирования в суспензии

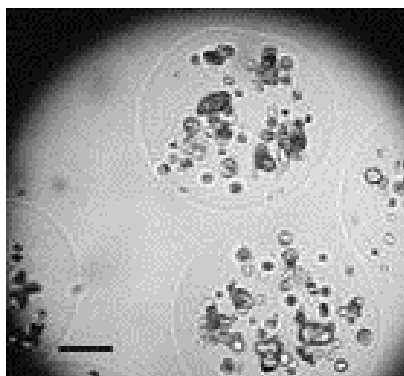
Метод культивирования	Концентрация антител в культуральной среде, мкг/мл
Метод произвольного культивирования (начало культивирования с плотностью культуры 3×10^5 клеток/мл)	$24,5 \pm 3$
Метод контролируемой плотности (концентрация клеток поддерживалась равной 6×10^5 клеток/мл)	$20,4 \pm 2,5$
Метод сверхплотной инокуляции (начало культивирования с плотностью культуры $4,5 \times 10^6$ клеток/мл)	$19,5 \pm 1,5$

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

Альтернативным способом выращивания для получения продукции целевого продукта клеточной культуры является применение микрокасул, микрогранул и других носителей. Сравнение уровня экспрессии антител в микрокасулах, микрогранулах и в суспензии производили в ходе культивирования в течение 18 дней (**Рисунок 3А**).



Б



В



Рисунок 3. Культивирование CHO S3 в микрокапсулах, микрогранулах и суспензионной культуре

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

Шкала 100 мкм.

Из **Рисунка 3А** можно сделать вывод о том, что культивирование стабильных антитело-продуцирующих линий в микрокапсулах приводило к увеличению продукции белка по

сравнению с суспензионной культурой и культивированием в микрогранулах, так как в микрокапсуле свободного объема для роста клеток было значительно больше.

Динамика селекции культур S1 и S3

Культуры S1 (Рисунок 4А) и S3 (Рисунок 4Б), 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 10 нМ и заканчивалась 500 нМ МТХ. Статистически достоверное расхождение ($p=0,01$) значений уровней продукции рекомбинантных антител против ФНО- α в ходе селекции началось с концентрации основного селективного агента МТХ равной 250 нМ. (Рисунок 4В). Гомогенность и чистота аффинно выделенных антител подтверждена методом белкового денатурирующего гель-электрофореза (Рисунок 4Г).

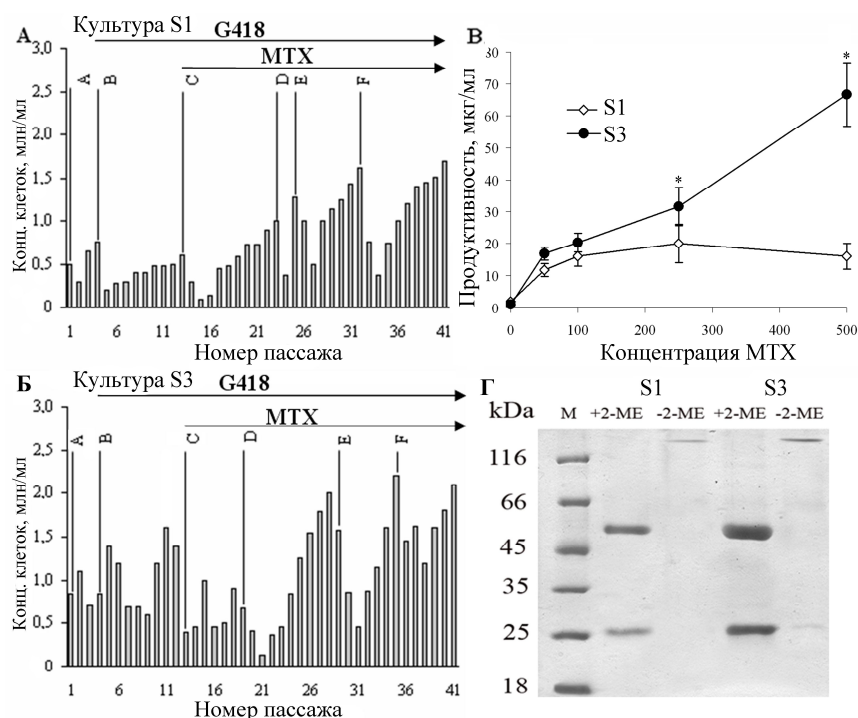


Рисунок 4. Динамика селекции клеточных линий CHO DG44, трансфицированных плазмидами рOptiVEC-НС и рсDNA 3.3-LC (А); рOptiVEC-LC и рсDNA 3.3-НС (Б)

А - OptiCHO, В - OptiCHO + G418 500 мкг/мл, С - OptiCHO + G418 500 мкг/мл + 50 нМ МТХ, D - OptiCHO + G418 500 мкг/мл + 100 нМ МТХ, Е - CD OptiCHO + G418 500 мкг/мл + 250 нМ МТХ, F - CD OptiCHO + G418 500 мкг/мл + 500 нМ МТХ

В. Сравнение продукции антител клеточными линиями 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-меркаптоэтанола.

Цитосортировка культур S1 и S3

С целью отбора клеточной популяции, характеризующейся повышенным уровнем экспрессии антител, к стабильной линии CHO S3-500 nM, 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 мкг/л.

Было выяснено, что и до, и после сортировки культура S3 характеризуется более высокими уровнями продукции целевого IgG по сравнению с культурой S1. Так, MFI культуры S3 составляло до и после сортировки 3,7 и 15,2, соответственно, по сравнению со значениями 2,8 и 9,2 для культуры S1 (**Рисунок 5В, Г**). Сортировка клеток S3 привела к увеличению продукции антител на 30%, а уровень биосинтеза антител культурой S1 значительно не изменился (**Рисунок 5Б**).

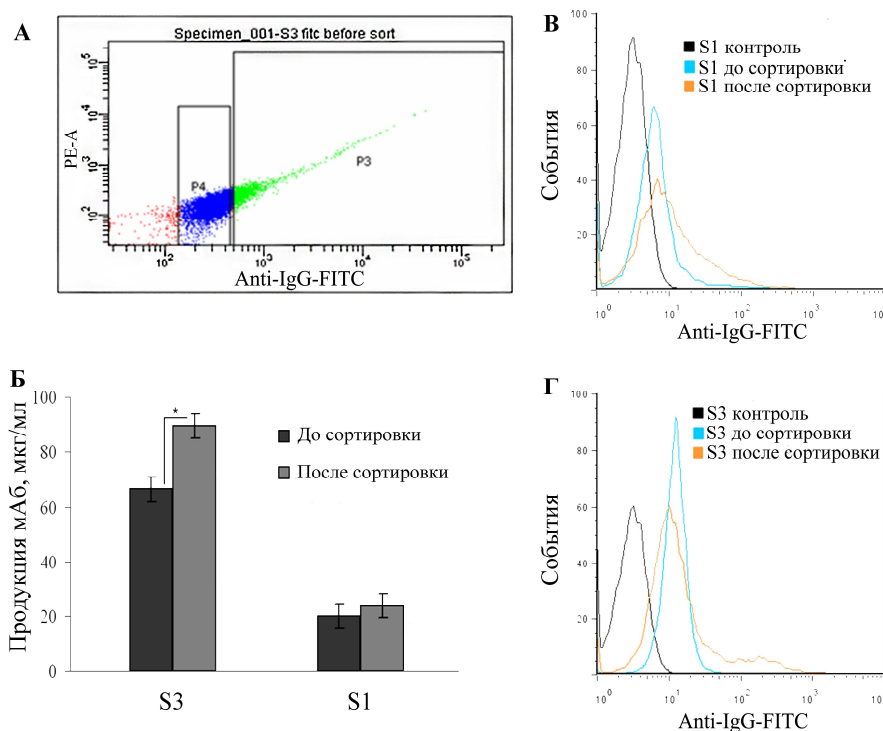


Рисунок 5. Оптимизация продукции антител на проточном цитосортировщике

- А.** Клетки линии S3 обработанные антителами против IgG-FITC человека до сортировки. В окне P3 находится 17% FITC-позитивных клеток. В окне P4 – FITC-негативные клетки.
- Б.** Продукция антител линиями S1 и S3 до сортировки и после сортировки и последующего культивирования в присутствии 1000 нМ МТХ.
- В, Г.** Цитосортировка культур S1 и S3. Изменение содержания FITC-позитивных клеток в культуре до и после проведения цитосортировки.

Проведенные эксперименты показали целесообразность использования метода цитосортировки для увеличения уровня продукции антител культурой клеток, ранее прошедшей селекцию высокими концентрациями метотрексата.

Анализ вариантов бипромоторной системы экспрессии

При использовании биплазмидных системы экспрессии для создания линии-продуцента гетеросубъединичных белков, к которым относится химерное антитело против ФНО- α , рост числа копий генов легкой и тяжелой цепей антитела достигается за счет использования двух селективных маркеров (**Рисунок 1А, Б**).

Прежде чем проводить сравнение бипромоторной и биплазмидной систем экспрессии между собой, было решено исследовать, какой из вариантов плазмиды рVPr-ABTNF (**Рисунок 1Г, 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.

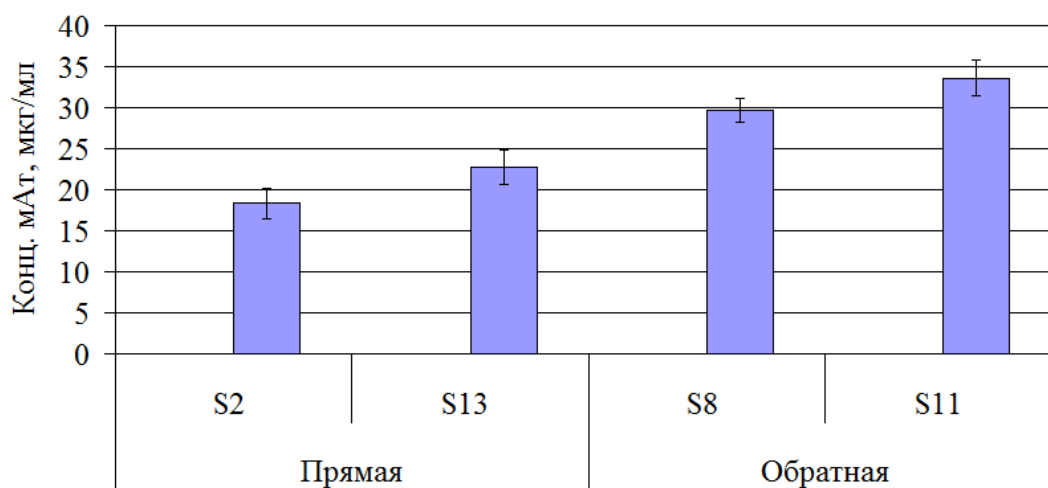


Рисунок 6. Сравнение максимальной продукции культур, полученных на основе вариантов бипромоторных плазмид на стадии селекции 25 нМ МТХ

На основании полученных данных нами был сделан вывод о наибольшей перспективности культуры S11 (обратной ориентацией генов цепей антитела). Данная культура в дальнейшем была использована для последующих раундов селекции и клонирования (**Рисунок 6**) в сравнении с культурой S3, полученной на основе биплазмидной системы экспрессии.

Сравнение биплазмидной и бипромоторной систем экспрессии

После прохождения процедуры клонирования культуры на флуоресцентном сортировщике колоний ClonePIX FL данные продуктивности её клонов сравнивали с исходной родительской культурой клеток. Каждая культура, являющаяся потомком культуры S11, прошла чередующиеся этапы селекции 5, 50, 500 и 2000 нМ МТХ. Культура, являющаяся потомком культуры S3, прошла чередующиеся этапы селекции сочетанием 500 мкг/мл G418 с 5, 50, 500 нМ МТХ и 1000 мкг/мл G418 в сочетании с 2000 нМ МТХ (**Рисунок 7**).

Различия в гетерогенности возникают из-за метода селекции культур. Так, в случае культуры S3 (**Рисунок 7А, В, Д, Ж**) селекция велась с использованием двух различных селективных агентов — МТХ и G418, направленных на селекцию клеток, содержащих плазмиды несущие отдельно гены лёгкой и тяжёлой цепей антитела против ФНО- α . Напротив, при селекции линии клеток S11 (**Рисунок 7Б, Г, Е, З**) селекция велась по пути, предполагающем эквимолярное увеличение копийности генов легкой и тяжелой цепей данного антитела.

Проведенные эксперименты показали, что как биплазмидная, так и бипромоторная системы экспрессии могут быть использованы для селекции клонов-продуцентов. Оптимальная концентрация МТХ для селекции клонов культуры S11 составила 500 нМ. Параллельный анализ культур, прошедших селекцию с применением концентрации МТХ равной 2000 нМ, показал, что продуктивность получаемых клонов культуры S11 практически не изменилась по сравнению с родительской культурой. 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 бипромоторной системы экспрессии (pBiPr), рассматриваемой в данной работе.

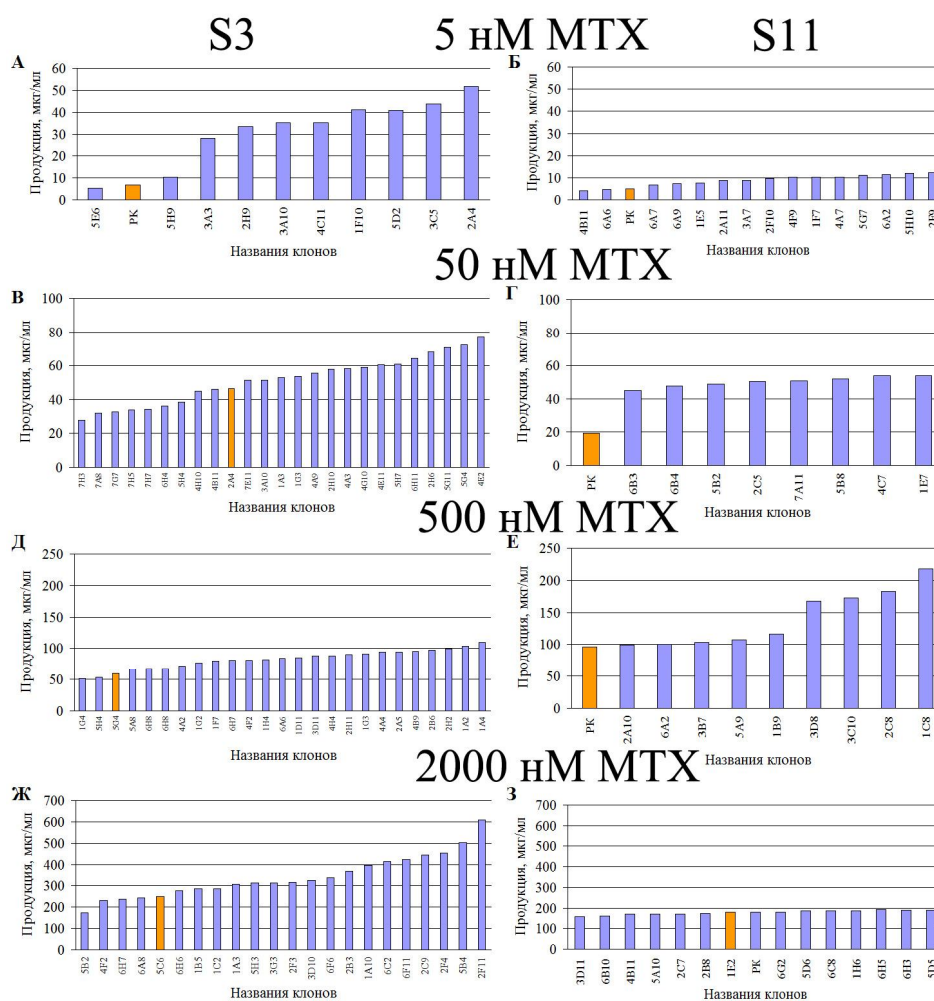


Рисунок 7. Продукция каждого из последовательных клонов-продуцентов (голубые столбцы), и уровень продукции родительских культур (оранжевые столбцы) для культур потомков линий S3 (А, В, Д, Ж) и S11 (Б, Г, Е, З)

Проведенные эксперименты показали, что как биплазмидная, так и бипромоторная системы экспрессии могут быть использованы для селекции клонов-продуцентов. Оптимальной концентрацией MTX для селекции клонов культуры S11 является 500 нМ. Параллельный анализ культур, прошедших селекцию с применением концентрации MTX равной 2000 нМ, показал, что продуктивность получаемых клонов культуры S11 практически не изменилась по сравнению с родительской культурой. Клоны-продуценты, выделенные из культуры S11, в отличие от клонов культуры S3, также прошедшей селекцию 2000 нМ MTX, 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 rViPr, рассматриваемой в данной работе. Дальнейшее увеличение концентрации селективного агента приводит к уменьшению

продукции клеточной линии подобно описанным ранее случаям [Balabashin, Kovalenko et al. 2014]. В целом, клоны, полученные из культуры S11, характеризуются большей однородностью в части продукции целевого белка, что может свидетельствовать о синхронизации уровня экспрессии генов легкой и тяжелой цепей антитела в бипромоторной системе экспрессии по сравнению с биплазмидной. Наиболее высокие уровни биосинтеза антител для биплазмидной системы достигаются при концентрации МТХ 2000 нМ.

Оптимизация среды культивирования и применение гидролизатов

Наряду с оптимизацией процессов селекции культуры и отбора клонов были исследованы подходы для усовершенствования процесса культивирования клеток в бессывороточных средах. На первом этапе была изучена возможность использования рекомбинантных белков-добавок рекомбинантного человеческого сывороточного альбумина (рЧСА) и рекомбинантного трансферрина человека (рТФР) для увеличения продуктивности культуры в среде известного состава IMDM. 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 [Bobik, Vorob'ev et al. 2008, Bobik, Poroov et al. 2019]. Также использовали инсулин и селенит натрия. Конечная концентрация белковых и небелковых компонентов в разрабатываемых средах представлена в **Таблице 2**.

Таблица 2. 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
рТФР	5,5	16,5	5,5	5,5	1,8	5,5	5,5	16,5	1,8
Na ₂ SeO ₃	0,0067	0,0067	0,0201	0,0067	0,0067	0,0022	0,0067	0,0201	0,0022
рЧСА	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Для получения максимальной концентрации мАт культивирование продолжали в течение 14 сут до истощения питательных веществ в среде (**Рисунок 8**).

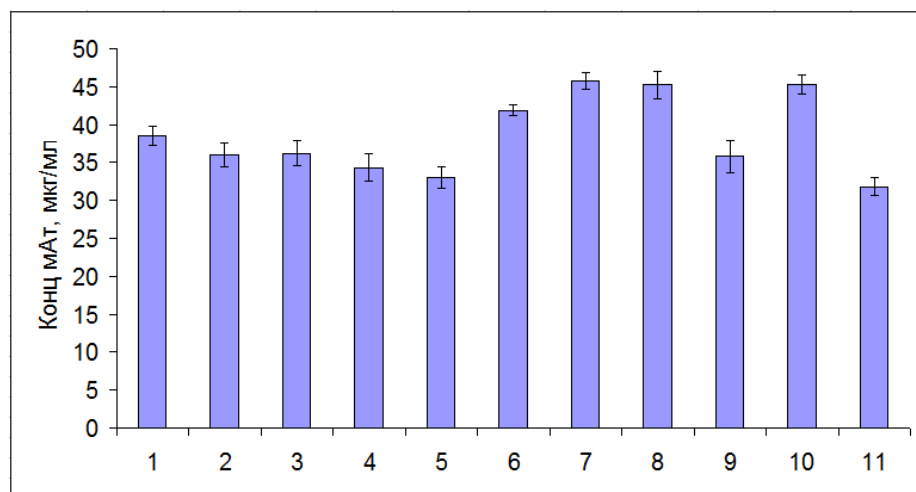


Рисунок 8. Конечная концентрация мАт в среде после 14 суток культивирования на средах с различным соотношением рекомбинантных белков-добавок в среде IMDM

1 - IMDM 3:1:1, 2 - IMDM 1:3:1, 3 - IMDM 1:1:3, 4 - IMDM 1/3:1:1, 5 - IMDM 1:1/3:1, 6 - IMDM 1:1:1/3, 7 - IMDM 1:1:1, 8 - IMDM 3:3:3, 9 - IMDM 1/3:1/3:1/3, 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, где однократной считали 10 мг/л инсулина, 5,5 мг/л рТФР, 0,0067 Na₂SeO₃ и 1000 мг/л рЧСА. далее применяли однократную концентрацию.

В качестве дополнительных компонентов, необходимых для повышения эффективности среды культивирования, были исследованы гидролизаты растительных белков, которые экстрагировали из порошков пшеницы, подсолнечника, гороха, риса, рисовой муки и сои. После экстракции белков проводили их количественную и качественную характеристику (Рисунок 9).

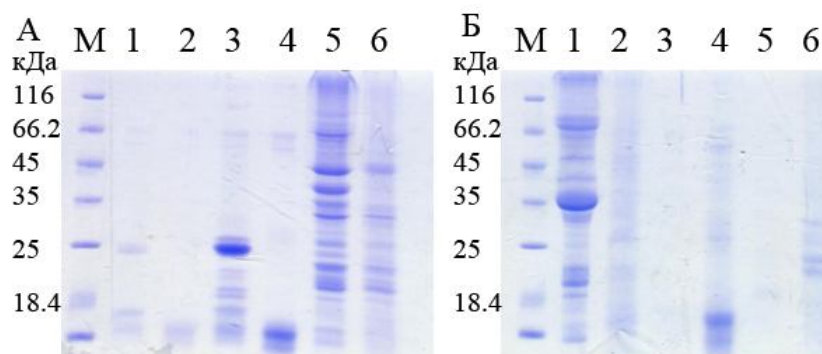


Рисунок 9. Электрофореграммы водных экстрактов растительных белков риса (А, 1-4) и гороха (А, 5 и 6) до (1, 3 и 5) и после (2, 4 и 6) гидролиза папаином; а также соевых белков (Б, 1 и 2), глютена (Б, 3 и 4) и подсолнуха (Б, 5 и 6).

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 10**.

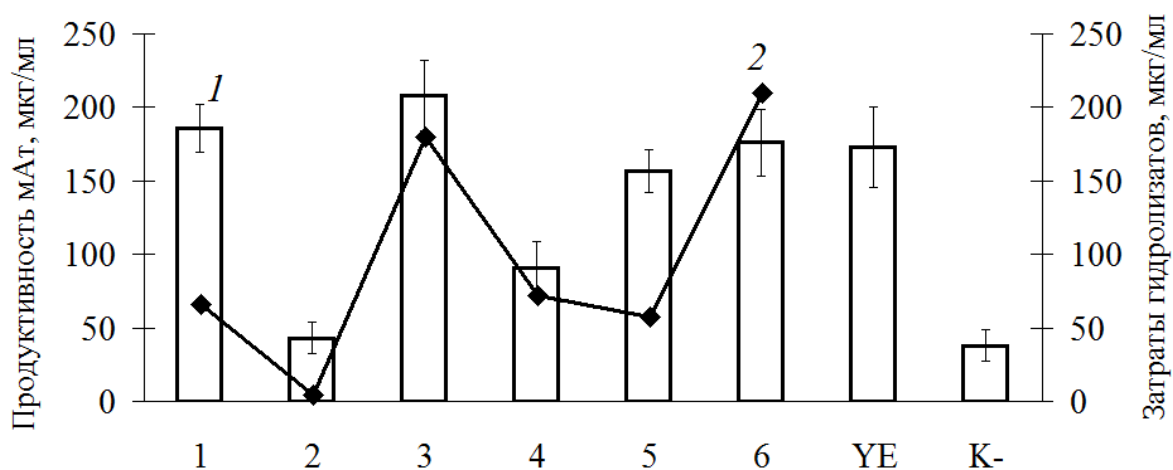


Рисунок 10. Продуктивность линии клеток (I, мАт, мкг/мл среды) при внесении гидролизатов неживотного происхождения (2, мкг/мл)

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 –10% дрожжевой экстракт.

Комбинация белков-добавок, входящая в состав разработанной среды, позволила повысить продуктивность стабильной культуры-продуцента мАт в среде IMDM на 44% по сравнению с комплексной коммерческой добавкой ITS (Insulin-transferrin-selenium). Анализ влияния различных растительных гидролизатов показал, что наряду с широко используемыми в мировой практике гидролизатами риса и сои перспективным является применение гидролизатов гороха и подсолнечника. Так, внесение в измененную среду IMDM гидролизатов белков гороха и подсолнечника, содержащих пептиды с молекулярной массой менее 5 кДа, способствовало увеличению продуктивности линии в 4,5 и 3,7 раза, соответственно, по сравнению с контролем.

Культивирование для получения продукта и введение подпитки культуры

Для изучения ростовых характеристик и продуктивности клона линии CHO S3-2F11 было проведено культивирование с применением полной ростовой среды OptiCHO. Также было осуществлено сравнительное культивирование данной линии с применением подпитки и без применения подпитки. Культура, получавшая подпитку с применением коммерческого препарата Cell Boost 7, увеличила свою продуктивность в ходе культивирования в 3,6 раза (Рисунок 11).

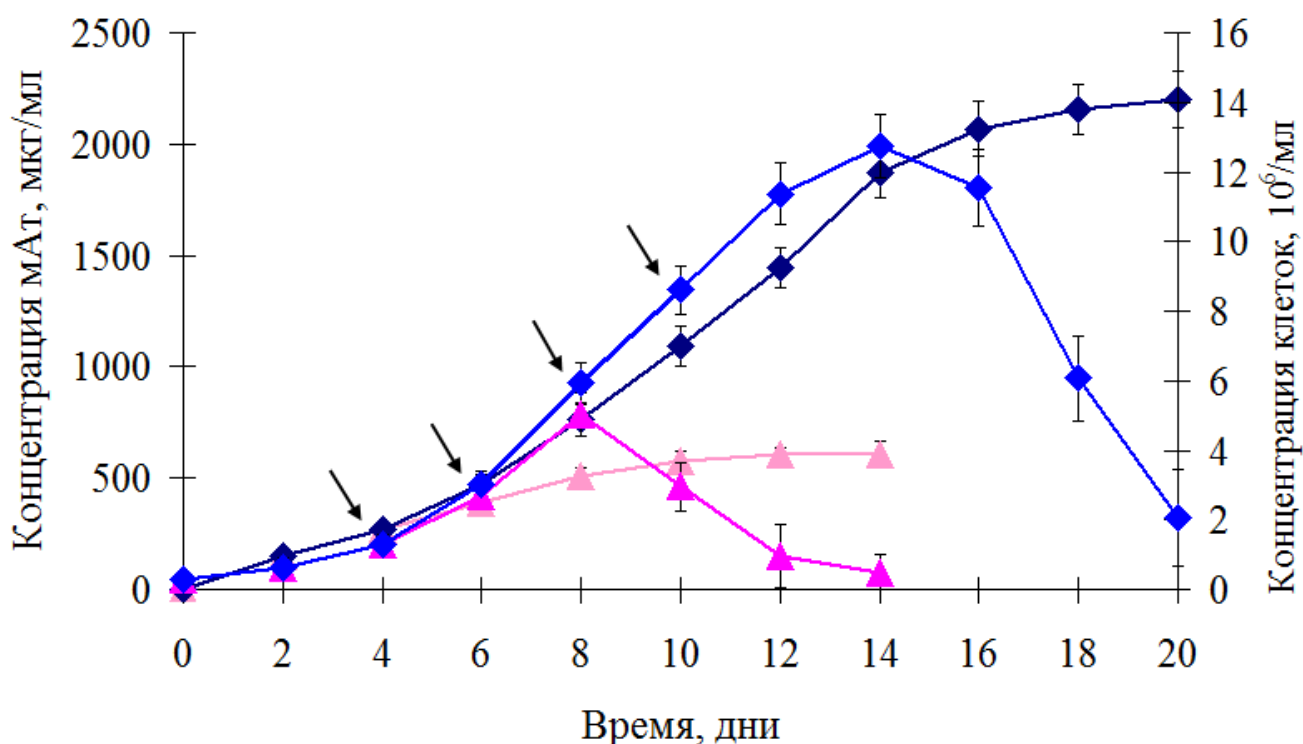


Рисунок 11. Сравнительное культивирование линии CHO S3-2F11 с применением подпитки и без применения подпитки культуры. Стрелками показаны дни внесения подпитывающего раствора в культуральный флакон

Проведение подкормки культуры из расчёта объема культивирования 1000 мл требует внесения 120 мл раствора компонента Cell Boost 7a и 12 мл раствора компонента Cell Boost 7b на один литр среды культивирования OptiCHO. Для достижения эквивалентного уровня продукции антител при применении только среды OptiCHO необходимо 3000 мл данной среды, а также проведения 3 одновременных или последовательных культивирований, что увеличивает финальную стоимость затраченных компонентов.

Таким образом проведённая работа позволяет сделать 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- α 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- α 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 порога, 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 наличии его гена 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- α . 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.

Научные статьи по теме диссертации, опубликованные в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий:

1. Балабашин Д. С., Калиберда Е. Н., Смирнов И. В., Мокрушина Ю. А., Бобик Т. В., Алиев Т. К., Долгих Д. А., Кирпичников М. П. Разработка бессывороточных сред на основе оптимальной комбинации рекомбинантных белков-добавок и гидролизатов неживотного происхождения для получения иммуноглобулинов // Прикладная биохимия и микробиология – 2020. - Т. 56, № 5, С. 503-513
2. Balabashin D., Kovalenko E., Toporova V., Aliev T., Panina A., Svirshchevskaya E., Dolgikh D., Kirpichnikov M. Production of anti TNF- α antibodies in eukaryotic cells using different combinations of vectors carrying heavy and light chains. // Cytotechnology. – 2015. – Т. 67(5), С. 761-72. doi: 10.1007/s10616-014-9714-3.
3. Балабашин Д.С., Топорова В.А., Панина А.А., Свирщевская Е.В., Алиев Т.К., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. Использование флуоресцентной метки для эффективного клонирования клеточных линий-продуцентов химеризованных антител к ФНО-альфа человека // Естественные и технические науки, издательство Спутник+ (М.), - 2012, № 5, С. 103-109
4. Балабашин Д.С., Зайцева-Зотова Д.С., Топорова В.А., Панина А.А., Марквичева Е.А., Свирщевская Е.В., Алиев Т.К. Способы увеличения продукции рекомбинантных антител в клеточных линиях CHO DG44. Современные проблемы науки и образования // Современные проблемы науки и образования, - 2011 том 5, С. 103-111

Выданы 3 патента на изобретения.

Тезисы докладов и материалы конференций:

1. **Балабашин Д.С., Алиев Т.К., Калиберда Е.Н., Долгих Д.А., Кирпичников М.П.** Использование композиции на основе растительных гидролизатов для повышения специфической продуктивности стабильных клеточных линий. Гены & Клетки XIV, №3, 2019
2. Алиев Т.К., Аргентова В.В., Панина А.А., Ильина Е.Н., Ларина М.В., Топорова В.А., **Балабашин Д.С.,** Солопова О.Н., Дементьева И.Г., Позднякова Л.П., Сергеева М.В., Долгих Д.А., Штро А.А., Клотченко С.А., Васин А.В., Свешников П.Г., Кирпичников М.П. Перспективы использования моноклональных антител для профилактики и терапии вирусных заболеваний. Сборник материалов международного форума "Биотехнологии: состояние и перспективы развития. Науки о жизни", 2018, с. 507
3. **Балабашин Д.С., Алиев Т.К., Панина А.А., Долгих Д.А., Кирпичников М.П.** Влияние соотношения ДНК легких и тяжелых цепей на уровень продукции и однородность

рекомбинантных антител при транзientной экспрессии в клетках млекопитающих. Объединенный форум XII чтения памяти академика Ю.А. Овчинникова и VIII Российский симпозиум Белки и пептиды, Москва, 18-22 сентября 2017 г. Спецвыпуск Acta Naturae, 2017, с. 179

4. Argentova V.V., **Balabashin D.S.**, Toporova V.A., Aliev T.K., Panina A.A., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. Novel bi-promoter expression system for the production of recombinant IgG antibody. The 7th PEGS Europe Protein & Antibody Engineering Summit (2–6 November 2015 in Lisbon, Portugal.), Lisbon, Epic Sana Hotel, Португалия, 2-6 ноября 2015

5. **Балабашин Д.С.**, Топорова В.А., Панина А.А., Свирщевская Е.В., Алиев Т.К., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. Использование флуоресцентной метки для эффективного клонирования линий-продуцентов химеризованных антител к ФНО-альфа человека XXV Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, Россия, Россия, 2013

6. **Балабашин Д.С.**, Коваленко Е.И., Топорова В.А., Долгих Д.А., Панина А.А., Свирщевская Е.В., Алиев Т.К. Проточная клеточная сортировка как метод повышения продукции антител к фактору некроза опухоли человека в клетках млекопитающих. XXIII Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, Россия, Россия, 2011.

Патенты

1. Композиция на основе гидролизата белка гороха для повышения специфической продуктивности клеточных линий продуцентов и способ её получения. Патент РФ на изобретение №2741088

2. Композиция на основе гидролизата белка подсолнечника для повышения специфической продуктивности клеточных линий продуцентов и способ её получения. Патент РФ на изобретение №2741086

3. Рекомбинантная плазмидная ДНК, кодирующая химерное антитело против фактора некроза опухоли альфа человека, линия эукариотических клеток-продуцент химерного антитела и способ получения химерного антитела. Патент РФ на изобретение №2555533