

УДК: 573.6.086.83: 579.66

СПОСОБЫ УВЕЛИЧЕНИЯ ПРОДУКЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ CHO DG44

Балабашин Д.С.^{1,2}, Зайцева-Зотова Д.С.¹, Топорова В.А.¹, Панина А.А.¹, Марквичева Е.А.¹, Свирщевская Е.В.¹, Алиев Т.К.^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, Россия, e-mail: aliev@ibch.ru

²Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия

Получена клеточная линия CHO DG44, продуцирующая рекомбинантные антитела к фактору некроза опухоли-альфа. Исследовано влияние плотности клеточного инокулята и режима культивирования клеток в суспензии на уровень биосинтеза антител. Наибольший выход антител наблюдается при плотности инокулирования 3×10^6 клеток/мл. Предложена альтернатива культивированию клеток в суспензии, которая представляет собой культивирование клеток в гидрогелевых микрогранулах на основе альгината кальция или в альгинат-олигохитозановых полупроницаемых микрокапсулах. Показано, что уровень продукции антител клетками CHO DG44, включенными в полимерные микрокапсулы, превышает уровень продукции белка при суспензионном режиме культивирования.

Ключевые слова: рекомбинантные антитела, CHO, DG44, иммобилизация клеток, альгинат, хитозан.

THE METHODS TO INCREASE RECOMBINANT ANTIBODY PRODUCTION BY CHO DG44 CELL LINE

Balabashin D.S.^{1,2}, Zaytseva-Zotova D.S.¹, Toporova V.A.¹, Panina A.A.¹, Markvicheva E.A.¹, Svirschevskaya E.V.¹, Aliev T.K.^{1,2}

¹Shemyakin - Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia, e-mail: aliev@ibch.ru

²M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The cell line CHO DG44 producing recombinant antibodies (Abs) to human tumor necrosis factor-alpha has been obtained. The influence of cell inoculation density and cultivation protocols on the level of Ab biosynthesis has been studied. The highest Ab yields have been observed at the inoculation density 3×10^6 cells/ml. The alternative method to cells-in-suspension cultivation has been proposed, which is the cell cultivation in calcium alginate hydrogel microgranules or alginate chitosan semipermeable microcapsules. It has been shown that the Ab production level by CHO DG44 cells entrapped into polymer microcapsules exceeds that of the cells-in-suspension cultivation regime.

Keywords: recombinant antibodies, CHO, DG44, cell immobilization, alginate, chitosan.

Введение

Рекомбинантные (химерные, гуманизированные или полностью человеческие) антитела относятся к активно развиваемому высокоэффективному сегменту фармацевтических препаратов биологического происхождения [5]. Возрастающая роль рекомбинантных антител в терапии онкологических, аутоиммунных, инфекционных заболеваний требует разработки производительных способов их биосинтеза в клеточных линиях млекопитающих. В фармацевтической индустрии задача производства терапевтических антител решается путем селекции стабильных клеточных линий-продуцентов и их адаптации к ферментации. Данный способ получения требует значительных временных и материальных затрат. Вместе с тем на этапе биоинженерной

разработки антител возникает необходимость получения в короткие сроки в лабораторных условиях относительно небольших (20-50 миллиграмм) количеств белка с целью изучения его биологических свойств. В настоящей работе предложен ряд способов повышения продуктивности клеточной линии CHO DG44, экспрессирующей полноразмерные рекомбинантные антитела к фактору некроза опухолей-альфа (ФНО-альфа), при культивировании 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 [2, 3].

Цель исследования

Увеличение биосинтеза антител с помощью оптимизации условий культивирования клеточной линии CHO DG44 в суспензии, микрогранулах и микрокапсулах.

Материалы и методы

Для получения стабильной клеточной линии плазмидные вектора рOptiVEC-ТОРО и рсDNA3.3-ТОРО (Invitrogen, США) модифицировали превращением в кольцевые плазмиды посредством встраивания полилинкера, содержащего ряд сайтов рестрикции, часто используемых при клонировании. В каждый из полученных модифицированных векторов по отдельности клонировали гены тяжелой (H) и легкой (L) цепей химерного антитела к ФНО-альфа, в результате чего были получены 4 экспрессионные плазмиды, рOptiVEC-L, рOptiVEC-H, рсDNA3.3-L, рсDNA3.3-H.

Трансфекцию клеток CHO DG44 осуществляли методом электропорации на приборе Amaha® Nucleofector® II (Lonza, Великобритания) по методике, предложенной производителем, с использованием 5 мкг каждой из плазмидных конструкций. Селекцию продуцирующей линии проводили в 3 этапа. Первым этапом селекции было переведение культуры на среду OptiCHO, не содержащую гипоксантина и тимидина. Через 2 недели на втором этапе в среду OptiCHO добавляли антибиотик G418 (Invitrogen, США) в концентрации 500 мкг/мл. Продолжительность данного этапа селекции также составляла 2 недели. Третьим этапом было постепенное увеличение концентрации метотрексата (MTX) (УфаВИТА, Россия). Селекцию MTX начинали с минимальных концентраций MTX и увеличивали в 2 раза после прохождения предыдущего этапа и восстановления скорости удвоения популяции.

Уровень продукции антител оценивали с помощью метода непрямого иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантного человеческого ФНО-альфа (ИБХ РАН) для сорбции.

Микрогранулы и микрокапсулы с иммобилизованными в них клетками получали в стерильных условиях по методике, описанной ранее [6]. Олигохитозан (ММ 3500, степень деацетилирования 89%) [1], полученный химической деструкцией коммерческого высокомолекулярного хитозана (ММ 1200 кДа, Sigma-Aldrich, Германия) был любезно предоставлен проф. А. Бартковиакон (Западнопомеранский университет, г. Щецин, Польша).

Аликвоты среды (500 мкл) собирали каждые 2 дня в течение 18 дней. 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.

Результаты и обсуждение

Получение стабильной клеточной линии, производящей химерные антитела против ФНО-альфа, было осуществлено с использованием метода амплификации числа копий генов в дигидрофолат/метотрексатной системе [4]. Плазмиды pOptiVEC-L, pOptiVEC-H, pcDNA3.3-L и pcDNA3.3-H, содержащие гены легкой и тяжелой цепей химерного антитела к ФНО-альфа, 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 L1 и L2 (Таблица 1).

Таблица 1
Стабильные клеточные линии для получения химерного антитела к ФНО-альфа

Клеточная линия	Вектор, содержащий легкую цепь	Вектор, содержащий тяжелую цепь
L1	pcDNA3.3	pOptiVEC
L2	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 L1 и L2 на различных этапах селекции MTX был сделан выбор в пользу дальнейшего использования линии L2. Из сравнения данных, приведенных на рис. 1, следует, что продуктивность линии L2 превышает уровень продукции антител в линии L1.

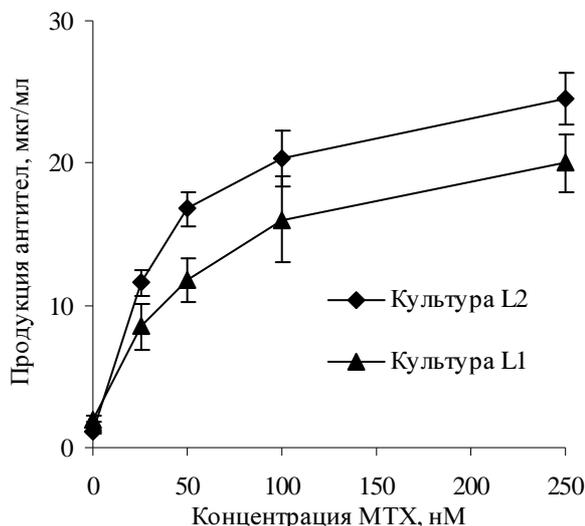


Рисунок 1. Продукция антител в клеточных линиях L1 и L2 в зависимости от концентрации метотрексата в среде культивирования.

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 L2 выращивали в присутствии 250 нМ MTX в качестве селектирующего агента. С целью выяснения оптимального метода культивирования в суспензии были использованы три основных подхода.

В методе «произвольного культивирования» 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 часов. Концентрацию антител оценивали по результатам ИФА (рис. 2). 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.

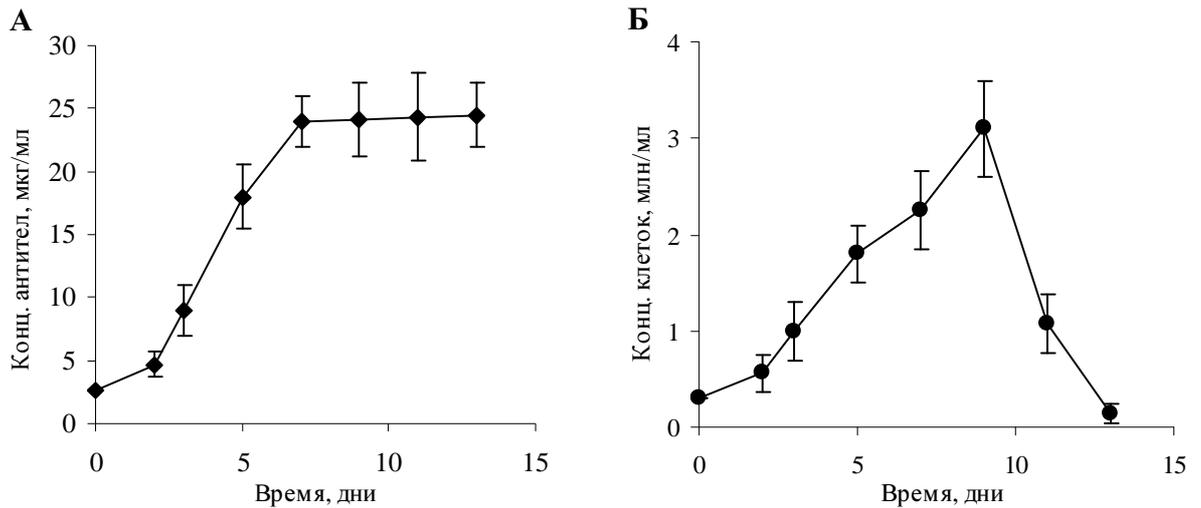


Рисунок 2. Уровень продукции антител (А) и количество живых клеток в культуре (Б) при произвольном культивировании клеток линии L2

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 часов, 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 (рис. 3).

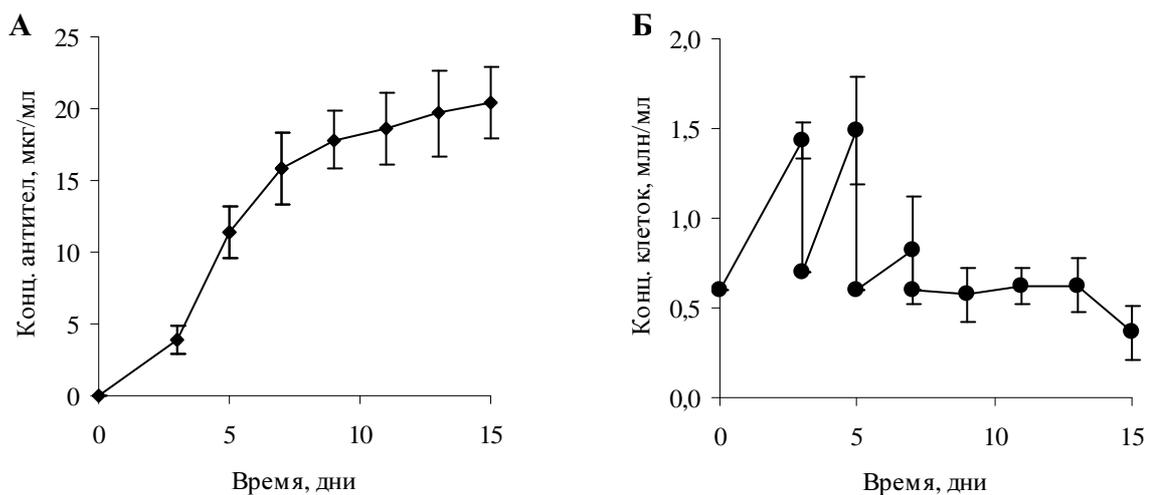


Рисунок 3. Уровень продукции антител (А) и количество живых клеток (Б) при контролируемом уровне плотности культуры

Метод сверхплотной инокуляции заключался в использовании высокой плотности инокулирования $4,5 \times 10^6$ 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 (рис. 4).

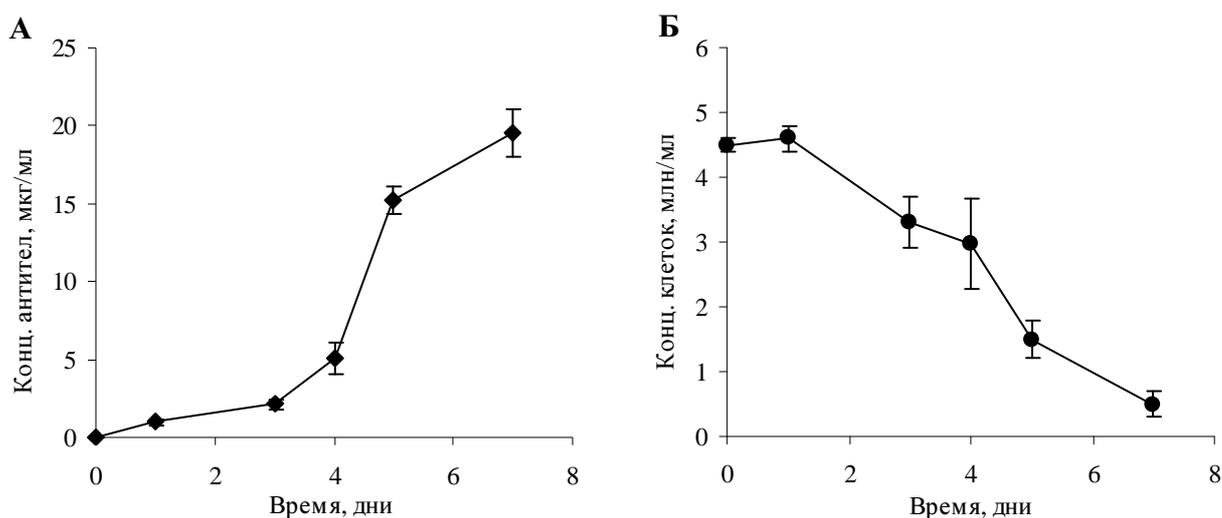


Рисунок 4. Уровень продукции антител (А) и количество живых клеток (Б) в культуре при высокой плотности инокулирования

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 2.

Таблица 2

Уровень продукции антител при различных методах культивирования в суспензии

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

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 CHO L2 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 CHO L2.

Сравнение уровня экспрессии антител в микрокапсулах, микрогранулах и в суспензии представлено на рис. 5.

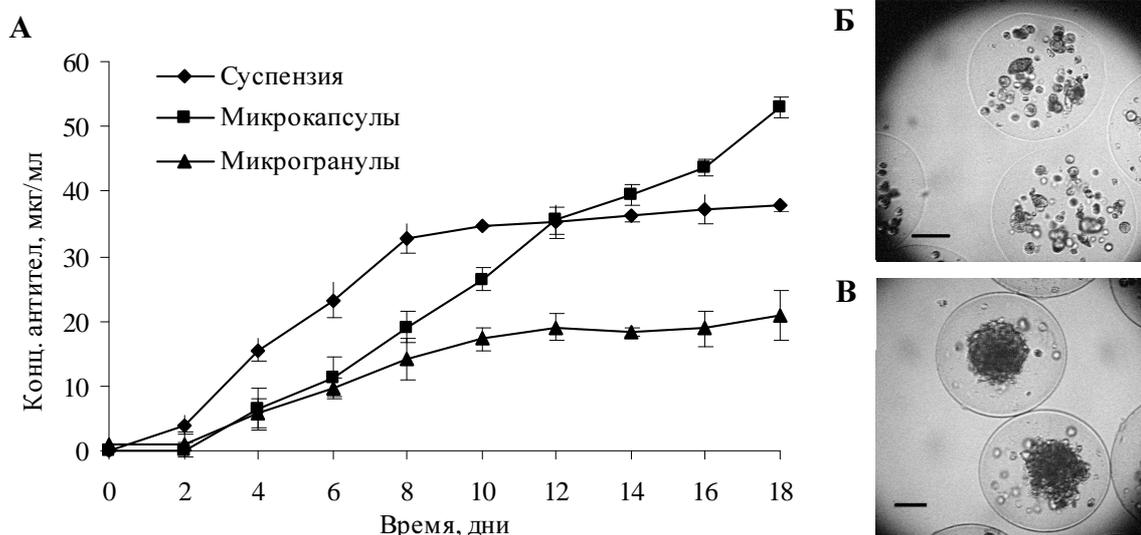


Рисунок 5. Культивирование CHO L2 в микрокапсулах, микрогранулах и суспензионной культуре: (А) продукция антител; (Б) изображения клеток на 14 день культивирования, растущих в CaAlg микрогранулах; (В) - в альгинат-олигохитозановых микрокапсулах. Шкала 100 мкм

Из рис. 5 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 млн/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 (рис. 5Б). 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 (рис. 5В).

Заключение

Проведено сравнение нескольких методов инокулирования клеточной биомассы при суспензионном культивировании клеток CHO DG44, продуцирующих рекомбинантные антитела к ТНФ-альфа. 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.

Список литературы

- [1] Bartkowiak A. Hydrogel microcapsules containing natural and chemically modified oligochitosans – mechanical properties and porosity / A. Bartkowiak, W. Brylak// *Polimery*. – 2006. – V.51(7-8). – P.547-554.
- [2] Lim F., Sun A. M. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas // *Science*. – 1980. – V.210. № 4472. – P. 908-910.
- [3] Murua A., Portero A., Orive G., Hernández R. M., de Castro M., Pedraz J. L. Cell microencapsulation technology: towards clinical application // *J. Control Release*. – 2008. – V.132(2). – P. 76-83.
- [4] Weidle U.H., Borgya A., Mattes R., Lenz H., Buckel P. Reconstitution of functionally active antibody directed against creatine kinase from separately expressed heavy and light chains in non-lymphoid cells // *Gene*. – 1987. – V.51(1). – P. 21 – 29.
- [5] Wurm F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells // *Nature Biotechnology*. – 2004. – V.22. – P. 1393 – 1398.
- [6] Zaytseva-Zotova D., Udartseva O., Andreeva E., Bartkowiak A., Bezdetsnaya L.,Guillemin F., Goergen J.-L., Markvicheva E. Polyelectrolyte microcapsules with entrapped multicellular tumor spheroids as a novel tool to study the effects of photodynamic therapy// *Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials*. – 2011. – V. 97B. № 2. – P. 255–262.

Рецензенты:

Румш Л.Д., д.х.н., профессор, заведующий лабораторией протеолитических ферментов Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва.

Еремин С.А., д.х.н., профессор, ведущий научный сотрудник, руководитель группы «Иммуноанализа» кафедры химической энзимологии, химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Работа получена 01.11.2011.