

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ СРЕДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ПРОДУКЦИЮ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ В СНО КЛЕТКАХ В УСЛОВИЯХ СТАБИЛЬНОЙ И ТРАНЗИЕНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ

Алиев Т. К.^{1,2}, Топорова В. А.¹, Аргентова В. В.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

Проведено исследование возможности увеличения уровня продукции рекомбинантных антител в клеточных линиях СНО за счет введения в состав культуральной среды ряда дополнительных компонентов. На примере транзientной культуры показано, что добавление натриевой соли вальпроевой кислоты приводит к 20 %-ному увеличению уровня экспрессии. Наибольший эффект наблюдается при добавлении 100 мМ сульфата цинка. При культивировании стабильной клеточной линии уменьшение концентрации L-глутамина до 0,2 мМ способствует увеличению продолжительности жизни культуры и повышению продуктивности в 2,5 раза. Культивирование в присутствии пониженных концентраций L-глутамина позволяет выращивать культуру до большей плотности в течение продолжительного времени, что особенно важно при выращивании культуры в больших объемах в спиннерах или биореакторах.

Ключевые слова: антитела, СНО, L-глутамин, транзientная экспрессия.

THE INFLUENCE OF DIFFERENT COMPONENTS OF CULTURAL MEDIUM ON THE PRODUCTION OF RECOMBINANT ANTIBODIES IN CHO CELLS IN TRANSIENT AND STABLE EXPRESSION MODES

Aliev T. K.^{1,2}, Toporova V. A.¹, Argentova V. V.²

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

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

We have studied the possibility to increase the production level of recombinant antibodies in CHO cells by using the addition of several components into cultural medium. Using the transient expression culture, it was shown that the addition of the sodium salt of valproic acid results in 20% increase of expression yield. The most prominent effect is observed when 100 mM zinc sulfate is added. Upon cultivation of stable cell line the reduction of L-glutamine concentration to 0.2 mM gives rise to increased culture viability and the growth in productivity by a factor of 2.5. The cultivation at low L-glutamine concentration can lead to higher cell density and prolonged cultivation, which is very important for scaled-up cell fermentation in spinner flasks and bioreactors.

Keywords: antibodies, CHO, L-glutamine, transient expression.

Введение

В последние годы постоянно увеличивается количество рекомбинантных антител, одобренных для терапевтического применения. Растущие потребности в производстве фармацевтических препаратов биологического происхождения стимулируют развитие исследований, направленных на повышение продуктивности клеточных линий млекопитающих, в которых получают свыше 60 % рекомбинантных терапевтических белков. Несмотря на развитие других способов экспрессии, именно биосинтез терапевтических белков в клетках млекопитающих остается приоритетным выбором, так как позволяет получить биологически-активные белки в нативной конформации за счет правильного фолдинга и пост-трансляционной модификации. Одной из наиболее распространенных

клеточных линий млекопитающих в фарминдустрии является клеточная линия СНО (клетки яичников китайского хомячка), которая на протяжении многих лет является наиболее изученным и стабильным объектом при производстве рекомбинантных белков. Преимуществом использования СНО клеток по сравнению с другими клетками, такими как NS0 (клетки миеломы мыши), ВНК (клетки почек детенышей хомяка), НЕК-293 (эмбриональные клетки почек человека), являются их хорошие характеристики при трансфекции, дальнейшей амплификации и селекции высокопродуктивных клонов. Кроме того, СНО клетки обладают способностью давать высокую плотность при выращивании в суспензии, не образуя кластеров и оседания на дно [7]. Наряду с совершенствованием промышленных способов получения белков, большое значение имеет разработка экспресс-методов повышения уровня продукции рекомбинантных белков при культивировании в лабораторных условиях. Одним из способов увеличения экспрессии требуемого продукта является применение разнообразных добавок к среде культивирования.

Одним из факторов, дающих позитивный эффект, является искусственное создание «стрессовых» условий культивирования [3]. Однако такое воздействие проводится только после того, как культура клеток достигла оптимальной концентрации. Особенное значение при получении высокой продуктивности клеточных линий имеют разработки по применению различных добавок, таких как натриевая соль вальпроевой кислоты (Na-VPA) или ее аналога – натрия бутирата (NaBu), а также солей цинка.

Соли Na-VPA или NaBu широко применяются для получения высокой экспрессии рекомбинантных белков [3]. Одним из наиболее очевидных факторов, приводящих к таким результатам, является ацетилирование гистонов. Ацетилирование ядерных гистонов оказывает основное влияние на сборку хроматина, но при этом также ингибирует рост клеток и вызывает клеточный апоптоз [4].

Цинк предположительно блокирует апоптоз в клетках человека при определенных условиях [5], а также способствует увеличению стабильности мРНК или с помощью изменения вторичной структуры, или, способствуя присоединению к мРНК стабилизирующих белков [1, 2]. Положительные результаты были достигнуты при применении низких концентраций сульфата цинка. Особенно это было продемонстрировано для продукции рекомбинантного интерферона-гамма. Присутствие таких добавок, как $ZnSO_4$ и NaBu, в сочетании с понижением температуры выращивания способно увеличить выход продукции от 2 до 8 раз [9].

Также одним из необходимых компонентов среды для выращивания клеток млекопитающих является глутамин. Однако метаболизм глутамина вызывает аккумуляцию аммония в клеточной культуре. Повышение концентрации аммония выше 2 мМ оказывает

негативное влияние как на рост клеток, так и на продуктивность рекомбинантных белков. Уменьшение концентрации глутамин в среде для роста CHO клеток улучшает жизнеспособность клеток, и, как следствие, продукцию рекомбинантных белков [6]. Удлинение периода жизнеспособности клеток связано с супрессией роста и арестом клеточного цикла, что и было подтверждено молекулярными исследованиями.

Цель исследования

Исследование влияния натриевой соли вальпроевой кислоты, сульфата цинка, а также глутамин на экспрессию рекомбинантных антител в клетках CHO.

Материалы и методы

Трансфекцию суспензионной клеточной линии CHO DG44 проводили с помощью трансфецирующего реагента FreeStyle Max Reagent (Invitrogen). Для трансфекции использовали плазмиды pOptiVEC-L и pcDNA3.3-H, содержащие гены легкой и тяжелой цепей химерного антитела к ФНО-альфа. Клетки после трансфекции выращивались на селективной бессывороточной среде CD OptiCHO. Измерение концентрации клеток и их жизнеспособности проводилось с использованием 0.04 % раствора трипанового синего в камере Горяева. По достижении плотности клеток 1.7×10^6 кл/мл и 90 % жизнеспособности, клетки были посеяны в 30 мл полной среды CD OptiCHO в концентрации 1×10^5 кл/мл в 125 мл флаконы.

Через 48 ч выращивания при 37 °C, 8 % CO₂, 130 об/мин в культуру добавляли стерильный 25 мМ раствор Na-VPA в ДМСО до конечной концентрации 0; 2.0; и 2.5 мМ. Стерильный 2 мМ раствор сульфата цинка в 1х растворе ФБС добавлялся в конечных концентрациях 0; 50; 100 мкМ. Среда заменялась каждые 2–3 дня.

Пробы для анализа методом ИФА были отобраны на 3-й и 6-й день инкубации. Концентрацию иммуноглобулинов в культуральной среде определяли методом непрямого сэндвич-ИФА по стандартной методике.

Анализ транзientной экспрессии адгезионной культуры CHO проводили в среде IMDM в присутствии 0.5 % диализованной сыворотки плодов коровы (DFBS).

Для селекции клонов, стабильно продуцирующих антитела, использовали автоматический флуоресцентный клеточный сортер ClonePix FL, а для оценки конфлюэнтности CloneSelect Imager (оба прибора производства фирмы Genetix, Великобритания). Отбор трансфектантов с наилучшей экспрессией антител проводился с помощью клональной селекции на полутвердой среде (Semi-Solid Media, Invitrogen, США) по методике, предложенной производителем.

Результаты и обсуждение

Влияние Na- соли вальпроевой кислоты (Na-VPA) , сульфата цинка и их комбинаций на продукцию антител в СНО клетках.

Эксперименты по исследованию влияния Na-VPA и сульфата цинка проводили на культуре клеток СНО, транзистентно экспрессирующей рекомбинантные антитела к ФНО-альфа. Для определения влияния Na-VPA клетки после трансфекции выращивались на селективной бессывороточной среде CD OptiСНО в концентрации 1×10^5 кл/мл в 125 мл флаконах. Через 48 ч выращивания в культуру была добавлена Na-VPA в конечной концентрации 2.5 мМ. Пробы для анализа методом ИФА были отобраны на 3-й и 6-й день инкубации. На рисунке 1 представлены результаты ИФА образцов среды, полученных в присутствии Na-VPA и в контрольных условиях (среда OptiСНО без добавок).

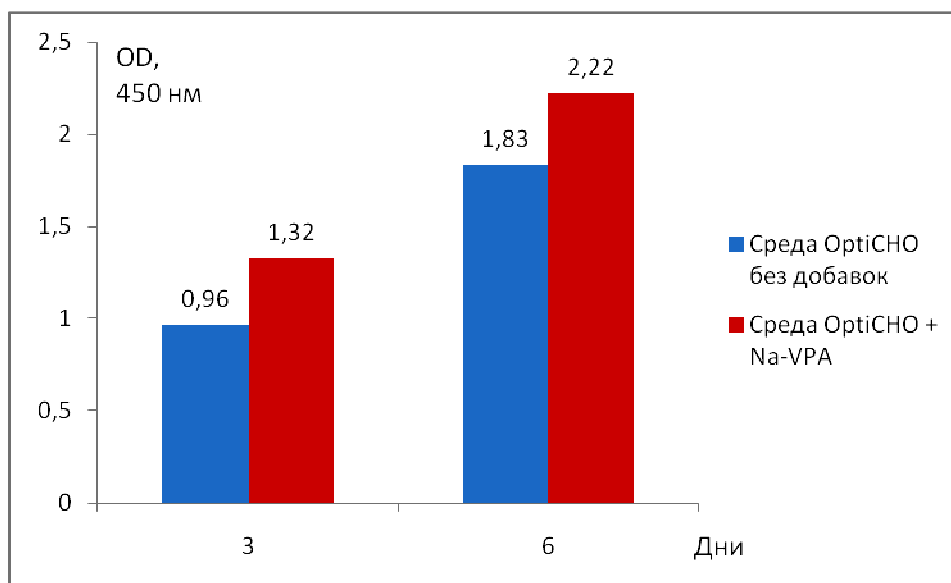


Рисунок 1. Влияние Na-VPA на уровень транзистентной экспрессии антител клетками СНО

Добавление Na-VPA до конечной концентрации 2.5 мМ более чем на 20 % повышает продуктивность суспензионной клеточной культуры на 6–7 день инкубации по сравнению с контрольными условиями. Более долгое выращивание приводит к снижению продуктивности за счет быстрой гибели клеток.

Влияние сульфата цинка по отдельности, а также в комбинации с Na-VPA проводили на адгезионных трансфецированных клетках СНО. После проведения трансфекции клетки были посеяны в лунки 24-луночного планшета в среду IMDM + 0.5 % DFBS в количестве 2×10^5 клеток на лунку. По достижении клетками конfluence 90 % среда была заменена на новую, содержащую различные варианты концентраций Na-VPA и сульфата цинка. Пробы

для анализа методом ИФА были отобраны через 48 ч инкубации с добавками.

Результаты ИФА образцов культуральной среды

Таблица 1

Состав среды культивирования	OD, 450 нм
IMDM + 0.5% DFBS	0,40
IMDM + 0.5% DFBS + 2 мМ Na-VPA	0,73
IMDM + 0.5% DFBS + 2 мМ Na-VPA + 25 мМ ZnSO ₄	0,90
IMDM + 0.5% DFBS + 2 мМ Na-VPA + 50 мМ ZnSO ₄	1,2
IMDM + 0.5% DFBS + 2 мМ Na-VPA + 100 мМ ZnSO ₄	1,1
IMDM + 0.5% DFBS +25 мМ ZnSO ₄	1,7
IMDM + 0.5% DFBS +50 мМ ZnSO ₄	3,0
IMDM + 0.5% DFBS +100 мМ ZnSO ₄	3,2

Добавление Na-VPA приводило приблизительно к 2-кратному увеличению продукции. Добавление сульфата цинка в концентрациях 25 мМ, 50 мМ и 100 мМ к среде, содержащей 2 мМ Na-VPA, приводило к 1.2-, 3.0- и 2.7-кратному увеличению продуктивности, соответственно. Однако наибольшее увеличение экспрессии антител было получено при выращивании клеток в среде с добавлением только ZnSO₄ в концентрациях: 25 мМ, 50 мМ и 100 мМ. Экспрессия было увеличена в 3.8, 7.5 и 8 раз по отношению к контролю, соответственно. Наибольший выход продукции был получен при инкубации 48 ч в среде, содержащей добавки. При увеличении времени инкубации, продуктивность начинала быстро снижаться и наблюдалась массовая гибель клеток. Концентрация сульфата цинка 150 мМ также приводила к быстрой массовой гибели клеток. Комбинация Na-VPA и сульфата цинка не приводила к увеличению экспрессии – наблюдалась значительно меньшая продуктивность.

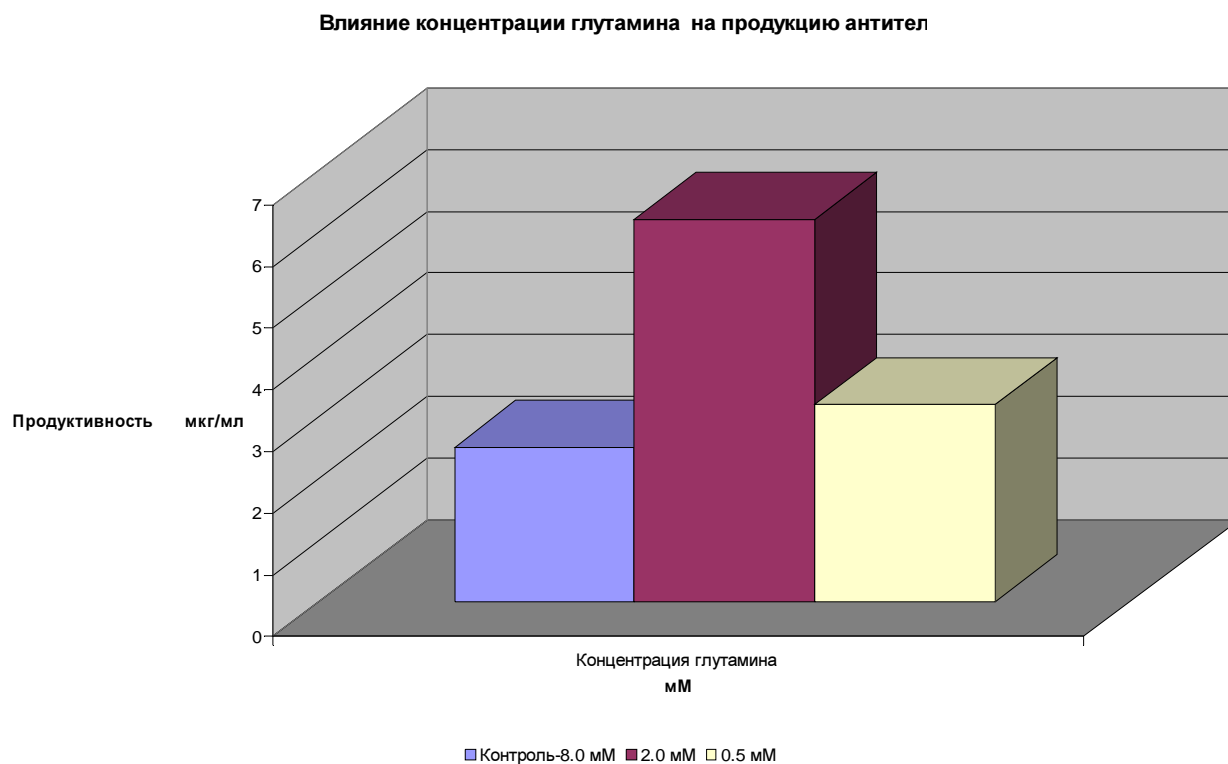
Таким образом, культивирование в среде, содержащей 100 мМ сульфата цинка, может применяться при получении небольшого количества продукта в малых объемах среды или при транзистентной экспрессии.

Влияние низких концентраций L-глутамин на продукцию рекомбинантных антител в СНО клетках в условиях стабильной экспрессии.

Обычное содержание L-глутамин в средах, используемых при выращивании СНО клеток, составляет 8 мМ. Такая концентрация глутамин способствует быстрому росту СНО клеток, но не является оптимальной при долгосрочном выращивании для получения продукта из-за накопления продуктов распада – лактата и аммония. Было исследовано,

приводит ли уменьшение концентрации глутамина к увеличению продолжительности жизни культуры и продуктивности. Для данного эксперимента трансфецированные клетки были отобраны с помощью клональной селекции на полутвердой среде (Semi-Solid media "Invitrogen") по предложенной методике с использованием приборов ClonePix и CloneSelect Imager фирмы "Genetix". Далее клетки были посеяны в среду IMDM + 10 % DFBS в концентрации 2×10^5 кл/мл в 24-луночный планшет. Для эксперимента в качестве добавок к основной среде использовались следующие концентрации глутамина: 8.0 мМ, 2 мМ и 0,5 мМ. Пробы для ИФА были отобраны на 12-й день инкубации. Концентрацию рекомбинантных иммуноглобулинов в культуральной среде определяли методом сэндвич-ИФА по стандартной методике (рисунок 2).

Концентрация 2.0 мМ L-глутамина в среде увеличивала продуктивность в 2.5 раза, а 0.5 мМ L-глутамина — в 1.2 раза по сравнению с контролем, содержащим стандартную среду с 8 мМ L-глутамином. Кроме того, клетки CHO, растущие в среде с пониженным содержанием глутамина, демонстрировали большую жизнеспособность, сопровождающуюся увеличением продолжительности жизни культуры: так, на 12 день инкубации наблюдался очень высокий уровень жизнеспособных клеток, в то время как в контроле с содержанием



8 мМ глутамина 75 % клеток погибли на 10-й день инкубации.

Рисунок 2. Влияние концентрации глутамина на продукцию антител клетками СНО

Культивирование в присутствии пониженных концентраций L-глутамина позволяет выращивать суспензионную культуру до большей плотности в течение продолжительного времени, что особенно важно при выращивании культуры в больших объемах в спиннерах или биореакторах.

Заключение.

В результате изучения влияния добавок натриевой соли вальпроевой кислоты, сульфата цинка, а также пониженных концентраций глутамина на уровень продукции рекомбинантных антител в клетках СНО при транзientной и стабильной экспрессии показано, что наибольший эффект наблюдается при добавлении 100 мМ сульфата цинка к ростовой среде, а также при понижении концентрации L-глутамина до 0.2 мМ.

Данная работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» (ГК № 16.512.11.2170) при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации.

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

Список литературы

1. Cao H. Expression, purification and biochemical characterization of antiinflammatory tristetraprolin: a zinc-dependent mRNA binding protein affected by posttranslational modifications // *Biochemistry*. – 2004. – Vol. 43 (43). – P. 13724-13738.
2. Harford J., Klausner, R.D. Coordinate post-transcriptional regulation of ferritin and transferrin receptor expression: the role of regulated RNA-protein interaction // *Enzyme*. – 1990. – Vol. 44 (1-4). – P. 28-41.
3. Kim N. S., Lee G. M. Overexpression of bcl-2 inhibits sodium butyrate-induced apoptosis in chinese hamster ovary cells resulting in enhanced humanized antibody production // *Biotechnol. Bioeng.* – 1994. – Vol. 10 (4). – P. 410-420.
4. Mimura Y., Lund J., Church S., Dong S., Li J., Goodall M., Jefferis R. Butyrate increases production of human chimeric IgG in CHO-K1 cells whilst maintaining function and glycoform profile // *J. Immunol. Methods*. – 2001. – Vol. 247. – P. 205-216.
5. Perry D. K., Smyth M. J., Stennicke H. R., Salvesen G. S., Durez P., Poirier G. G., Hannum Y. A. Zinc is a potent inhibitor of a apoptotic protease, Caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272 (30). – P. 18530-18533.

6. Rajendra R., Kiseljak D., Baldi L., Hacker D. L., Wurm F. M. Influence of glutamine on transient and stable recombinant protein production in CHO and HEK-293 cells // BMC Proceedings. – 2011. – Vol. 5 (Suppl. 8). – P. 35.
7. Schmidt F. R. Optimization and scale up of industrial fermentation process//Applied Microbiology and Biotechnology. – 2005. –Vol. 68. – P. 425-435.
8. Worthington M., Pelo J., Sachedina M., Applegate J., Arseneau K., Pizarro T. RNA binding properties of the AU-rich element-binding recombinant Nup475/TIS11/Tristetraprolin protein // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277. – P. 48558-48564.
9. Zuquel R., Prieto C., Etcheverrigaray M., Kratje R. Effect of sodium butyrate and zinc sulphate supplementation on recombinant human INF- β production by mammalian cell culture // Latin American Applied Research . – 2006. – Vol. 36. – P. 321-327.

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.

Свешников П. Г., д.б.н., профессор, генеральный директор Всероссийского центра молекулярной диагностики и лечения, г. Москва.