

АКУШЕРСТВО ГИНЕКОЛОГИЯ РЕПРОДУКЦИЯ

Включен в перечень ведущих
рецензируемых журналов и изданий ВАК

2017 • Том 11 • № 3



OBSTETRICS, GYNECOLOGY AND REPRODUCTION

ISSN 2313-7347

2017 Vol. 11 No 3

www.gynecology.su

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩИЙ ГОРМОН ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ТЕРАПИИ БЕСПЛОДИЯ: ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИЙ-ПРОДУЦЕНТОВ

Орлова Н.А.¹, Ковнир С.В.¹, Ходак Ю.А.¹, Ползиков М.А.², Воробьев И.И.¹

¹ ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва

² ООО «АйВиФарма», Москва

Резюме

Цель исследования: получение линии клеток, секретирующих максимальные количества лютеинизирующего гормона человека (ЛГ) в форме гетеродимера при отсутствии значимых количеств свободной альфа-субъединицы гормона. **Материалы и методы.** Для согласованной экспрессии генов субъединиц ЛГ человека в клетках яичника китайского хомячка использовали пару оригинальных плазмид семейства p1.1, содержащих протяженные некодирующие области гена фактора элонгации трансляции 1 альфа китайского хомячка и фрагмент конкатемера длинного концевой повтора вируса Эпштейна-Барр. Области открытых рамок считывания генов субъединиц ЛГ клонировали в векторы с генами дигидрофолатредуктазы (DHFR) или глутаминсинтазы (GS), трансфицировали в клетки, амплифицировали под действием метотрексата и получали клональные линии-продуценты методом предельных разведений. **Результаты.** Для пары плазмид, в которой ген альфа-субъединицы связан с GS, а ген бета-субъединицы – с DHFR, удельная продуктивность первичной стабильно трансфицированной популяции клеток составила 0,1 пг/клетка/день при времени деления клеток 37 часов, а для обратной пары плазмид – 0,3 пг/клетка/день и 48 часов. Для первой популяции клеток и для полученных из нее клональных линий была проведена амплификация генетических кассет в геноме клеток под действием возрастающих концентраций метотрексата. Для поликлональной популяции было зафиксировано возрастание продуктивности клеток до 2,2 мкг/10⁶ клеток по достижении концентрации метотрексата 8 мкМ; для клональных линий клеток многократное возрастание продуктивности до значения 0,09 мкг/10⁶ клеток было зафиксировано только для одной линии из шести после одного шага амплификации. **Заключение.** Потенциально промышленно пригодные клеточные линии, секретирующие значительные количества гетеродимерного ЛГ без значимой примеси свободной субъединицы, могут быть получены при помощи пары плазмидных векторов, кодирующих гены субъединиц ЛГ и селекционные маркеры DHFR или GS. Ко-трансфекция плазмид и последующая их амплификация в геноме клеток-продуцентов под действием метотрексата позволяет многократно увеличить уровень биосинтеза обеих субъединиц ЛГ.

Ключевые слова

Лютеинизирующий гормон человека, клетки яичника китайского хомячка, линии-продуценты, биофармацевтика, биоаналог.

Статья поступила: 21.07.2017 г.; в доработанном виде: 18.08.2017 г.; принята к печати: 11.09.2017 г.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии необходимости раскрытия финансовой поддержки или конфликта интересов в отношении данной публикации.

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Для цитирования

Орлова Н.А., Ковнир С.В., Ходак Ю.А., Ползиков М.А., Воробьев И.И. Рекombинантный лютеинизирующий гормон человека для терапии бесплодия: получение линий-продуцентов. *Акушерство, гинекология и репродукция*. 2017; 11 (3): 33-42. DOI: 10.17749/2313-7347.2017.11.3.033-042.

RECOMBINANT HUMAN LUTEINIZING HORMONE FOR THE TREATMENT OF INFERTILITY: THE GENERATION OF PRODUCER CELL LINES

Orlova N.A.¹, Kovnir S.V.¹, Khodak Yu.A.¹, Polzikov M.A.², Vorobiev I.I.¹

¹ Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Russian Academy of Sciences (Research Center of Biotechnology RAS), Moscow

² IVFarma LLC, Moscow

Summary

The *aim* of the study was to obtain the cell line secreting the maximum amounts of the human luteinizing hormone (LH) heterodimer without significant amounts of free LH alpha-subunit. *Materials and methods.* A pair of original plasmids of the p1.1 family containing long non coding segments of the Chinese hamster translation elongation factor 1 alpha gene and a fragment of the concatemer of the Epstein-Barr virus long terminal repeat were used for the persistent expression of human LH subunit genes in Chinese hamster ovary cells. The open reading frame areas of the LH subunits genes were cloned into vectors with the dihydrofolate reductase (DHFR) or glutamine synthase (GS) genes, transfected into the cells, and amplified by methotrexate; following the final procedure of limiting dilution, clonal producer cells were obtained. *Results.* For a pair of plasmids, where the LH alpha subunit gene was associated with GS and the beta subunit gene was associated with DHFR, the rate of LH production by the initial stably transfected cell population was 0.1 pg/cell/day and the doubling time was 37 hours, for the reverse pair of plasmids – 0.3 pg/cell/day and 48 hours, respectively. For the initial cell population and for their clonal lines, we used increasing concentrations of methotrexate to amplify the genetic cassettes in the cell genome. In the polyclonal population an increase in the cell productivity up to 2.2 µg/10⁶ cells was observed at a concentration of methotrexate 8 µM; for the clonal lines – a significant productivity increase up to 0.09 µg/10⁶ cells was achieved in only one of six cell lines. *Conclusion.* Cell lines secreting significant amounts of heterodimeric LH without a significant admixture of free subunit can be obtained using a pair of plasmid vectors encoding the LH subunit genes and the selection markers DHFR or GS. Co-transfection of the plasmids and their subsequent amplification in the genome of producer cells under the selective pressure of methotrexate results in a significant increase in the biosynthesis rate of both LH subunits. The present study provides a rationale for a potential use of these lines in the industrial production of human luteinizing hormone.

Key words

Luteinizing hormone, Chinese hamster ovary cells, producer cell lines, biopharmaceuticals, biosimilar.

Received: 21.07.2017; **in the revised form:** 18.08.2017; **accepted:** 11.09.2017.

Conflict of interests

The authors declare they have nothing to disclose regarding the funding or conflict of interests with respect to this manuscript. Authors contributed equally to this article.

For citation

Orlova N.A., Kovnir S.V., Khodak Yu.A., Polzikov M.A., Vorobiev I.I. Recombinant human luteinizing hormone for the treatment of infertility: the generation of producer cell lines. *Obstetrics, gynecology and reproduction [Akusherstvo, ginekologiya i reproduksiya]*. 2017; 11 (3): 33-42 (in Russian). DOI: 10.17749/2313-7347.2017.11.3.033-042.

Corresponding author

Address: pr. 60-letiya Oktyabrya, 7, korp. 1, Moscow, Russia, 117312.
E-mail: ptichman@gmail.com (Vorobiev I.I.).

Введение

Лекарственные препараты лютеинизирующего гормона человека (ЛГ) и фолликулостимулирующего гормона человека (ФСГ) широко используются в клинической практике при терапии бесплодия, в первую очередь при проведении экстракорпорального оплодотворения [1-4]. ЛГ и ФСГ для первых лекарственных препаратов выделяли из мочи менопаузаль-

ных женщин, впоследствии были получены препараты полностью очищенных рекомбинантных ЛГ и ФСГ. Эти гормоны представляют собой гетеродимерные гликопротеиды, с одинаковой альфа-субъединицей и различающимися бета-субъединицами (рис. 1А). Свободные бета-субъединицы ЛГ и ФСГ практически не способны взаимодействовать со своими рецепторами, биологическую активность в обоих случаях

проявляют только гетеродимерные, полностью гликозилированные формы гормонов [5]. По этой причине для получения рекомбинантных гормонов пригодны только культивируемые клетки млекопитающих, в которых обеспечивается корректное гликозилирование целевых белков. Используемые в клинической практике варианты лекарственных препаратов рекомбинантного ЛГ получены при помощи клеток яичника китайского хомячка (СНО). Поскольку клеточные линии – продуценты оригинальных лекарственных препаратов ЛГ были получены более 20 лет назад, их удельная продуктивность была достаточно низкой. Методы получения этих линий-продуцентов не являются оптимальными для создания линий-продуцентов воспроизведенных препаратов ЛГ (биоаналогов), для которых исходно предполагаются значительно более низкие затраты на процесс производства целевого белка.

Ранее нами была получена клеточная линия – продуцент ФСГ человека с удельной продуктивностью более 10 пг/клетка/день, при ее простом периодическом культивировании титр продукта составлял более 50 мг/л [6]. Это потенциально позволяет производить необходимые для коммерческого производства количества ФСГ при помощи одного настольного биореактора с объемом сосуда 20 л.

Для получения данной клеточной линии использовали плазмидный вектор p1.1, содержащий протяженные некодирующие области гена фактора элонгации трансляции 1 альфа китайского хомячка, фрагмент конкатемера длинного концевой повтора вируса Эпштейн-Барр и маркер устойчивости DHFR, связанный с геном целевого белка при помощи аттенуированного внутреннего сайта связывания рибосом вируса энцефаломиокардита (EMCV IRES) [7]. Гены субъединиц ФСГ были помещены в этот плазмидный вектор тандемно и сцеплены при помощи EMCV IRES дикого типа [8]. При трансфекции данной генетической конструкции в клетки СНО секреция существенных количеств гетеродимера ФСГ наблюдалась только при расположении гена альфа-субъединицы гормона в первом цистроне, а гена бета-субъединицы ФСГ – после EMCV IRES, при этом большая часть альфа-субъединицы ФСГ секретировалась в культуральную среду в свободной форме. Для получения окончательной линии продуцентов ФСГ провели трансфекцию дополнительной плазмиды, кодирующей только ген бета-субъединицы ФСГ и ген устойчивости к гигромицину, после чего отобрали ряд клональных линий клеток, секретирующих преимущественно гетеродимерный гормон. Такой способ получения линий-продуцентов требует больших затрат времени и не позволяет найти наиболее продуктивные клоны клеток в поликлональной популяции, поскольку при трансфекции второй плазмиды ее интеграция в геном клеток происходит менее чем в 1% случаев.

Мы предположили, что высокопродуктивный продуцент гетеродимерного белка можно получить

более простым способом, а именно – ко-трансфекцией пары плазмид, кодирующих гены субъединиц этого белка и различные совместимые гены устойчивости, например, дигидрофолатредуктазу (DHFR), обеспечивающую устойчивость к метотрексату (MTX), и глутаминсинтазу (GS), обеспечивающую устойчивость к метионилсульфоксимиу (MSX) (рис. 1Б). При одновременном введении в клетки пары плазмид в части случаев может происходить их интеграция в один геномный локус. Для таких клеток последующая амплификация генетических конструкций в геноме под действием возрастающих концентраций ингибитора DHFR метотрексата будет приводить к одновременному увеличению копияности генов обеих субъединиц, то есть к повышению уровня биосинтеза целевого гетеродимерного белка. Можно предположить, что в полученной поликлональной популяции клеток будут содержаться клоны с различными относительными уровнями биосинтеза альфа- и бета-субъединицы. При последующем получении клональных линий могут быть найдены и отобраны те из них, которые секретируют вместе с гетеродимерной формой целевого белка минимальные количества той свободной субъединицы, которую легче отделить от целевого белка при его последующей хроматографической очистке.

Для проверки этих предположений был выбран целевой белок ЛГ человека как имеющий большую медицинскую значимость и частичное сходство с ФСГ человека, что позволяет сравнить относительную эффективность двух подходов к созданию продуцентов гетеродимерных белков – при помощи одной полицистронной генетической конструкции и «корректирующей» плазмиды, либо при помощи пары плазмид, кодирующих по одному гену субъединиц целевого белка.

Несмотря на то, что проблемы координированной экспрессии нескольких генов в культивируемых клетках млекопитающих рассматриваются во множестве работ [9], практически во всех случаях такие исследования проводят для гуманизированных антител. Применимость полученных в этих работах результатов для разработки систем экспрессии гонадотропных гормонов весьма ограничена из-за отсутствия гомологии цепей иммуноглобулинов и гонадотропных гормонов и присутствия N-связанных олигосахаридов в обеих цепях гонадотропных гормонов (рис. 1А), но не в легкой цепи иммуноглобулинов. В работах, описывающих создание линий клеток-продуцентов гонадотропных гормонов человека, были использованы как пары моноцистронных плазмид, так и векторы с тандемным расположением генов [10], однако во всех случаях были применены стандартные плазмиды с короткими промоторными областями, в основном – цитомегаловирусным промотором (CMV). Поведение таких плазмид при их интеграции в геном продуцентов значительно отличается от поведения разработанных нами плазмид p1.1.

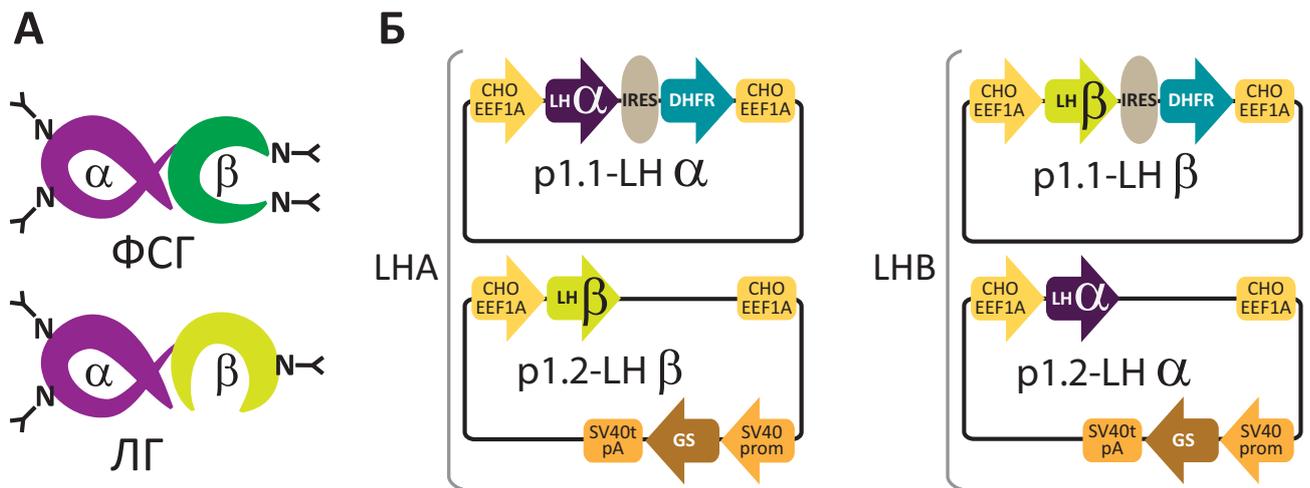


Рисунок 1.

А. Схемы гетеродимеров фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов.

Альфа-субъединицы этих гормонов идентичны и содержат два сайта N-гликозилирования. Бета-субъединица ЛГ содержит один сайт N-гликозилирования, ФСГ – два сайта N-гликозилирования.

Б. Схемы использованных генетических конструкций.

LHα – α-цепь лютеинизирующего гормона; LHβ – β-цепь лютеинизирующего гормона;

CHO EEF1A1 – районы, фланкирующие ген EEF1A1 китайского хомячка, содержащие промотор, первый интрон, терминатор и сигнал полиаденилирования гена EEF1A1; IRES – внутренний сайт связывания рибосом EMCV; DHFR – дигидрофолатредуктаза мыши; SV40p и SV40t – промотор и терминатор вируса SV40; GS – глутаминсинтаза мыши.

Figure 1.

A. Schematic representation of the follicle-stimulating and luteinizing hormones heterodimers.

The alpha subunits of these hormones are identical and contain two N-glycosylation sites. The beta-subunit of LH contains one N-glycosylation site, and FSH – two N-glycosylation sites.

B. Schematic representation of genetic constructs used in the study.

LHα – the α-chain of luteinizing hormone; LHβ – the β-chain of luteinizing hormone; CHO EEF1A1 – the areas flanking the Chinese Hamster EEF1A1 gene, containing the promoter, the first intron, terminator and polyadenylation signal of the EEF1A1 gene; IRES – the internal ribosome binding site of the EMCV; DHFR – murine dihydrofolate reductase; SV40p and SV40t – the promoter and terminator of the SV40 virus; GS – murine glutamin synthase.

Материалы и методы

Для получения синтетической ДНК, кодирующей открытую рамку считывания бета-цепи ЛГ, использовали оптимизацию кодонов в соответствии с данными о частотности кодонов CHO из Codon Usage Database [11]. Обратную трансляцию аминокислотной последовательности зрелой бета-цепи ЛГ из публичной базы данных GenPept P01229.3 и оптимизацию синтетического гена проводили в программе Leto (v.1.0.11, Entelechon).

Была рассчитана следующая оптимизированная нуклеотидная последовательность синтетического гена: ATG GAG ATG CTG CAG GGC CTC TTG CTC TTA CTT STA CTG AGT ATG GGT GGG GCC TGG GCT TCT CGG GAA CCT STA CGT CCT TGG TGC CAT CCG ATC AAC GCA ATT CTG GCA GTT GAG AAG GAA GGC TGT CCT GTG TGC ATA ACA GTC AAT ACC ACA ATT TGT GCA GGC TAC TGC CCA ACT ATG ATG AGG GTG TTG CAG GCT GTT CTT CCT CCC CTG CCT CAA GTC GTG TGC ACC TAT CGC GAC GTG AGA TTT GAG TCA ATC AGA CTG CCT GGC TGC CCC AGA GGT GTC GAT CCT GTT GTG TCA TTC CCT GTT GCA CTG TCC TGT CGC TGT GGA CCA TGT AGG CGA AGC ACT AGT GAT TGC GGA GGA CCC AAA GAT CAC CCA CTG ACC TGT GAC CAC CCA CAG CTT TCT GGC CTC TTG TTT CTC.

Фрагмент ДНК, кодирующий бета цепь ЛГ, был получен методом синтеза из олигонуклеотидов, представленных в **таблице 1**, и клонирован в Т-вектор pAI-2T (ЗАО «Евроген», Россия) с образованием плазмиды pAL-2-LH-β.

На основе плазмидных векторов p1.1 [7] и p1.2-GS [12] созданы 2 пары экспрессионных конструкций для экспрессии альфа- и бета-цепей лютеинизирующего гормона человека:

на основе вектора p1.1 с маркером устойчивости DHFR: p1.1-LH-β, p1.1-LH-α;

на основе вектора p1.2-GS с маркером устойчивости GS: p1.2-GS-LH-β, p1.2-GS-LH-α.

Акцепторные плазмиды расщепляли эндонуклеазами *AbsI* и *NheI*. В качестве донорных плазмид использовали pAL-2-LH-β/ *AbsI* и *NheI*; pUC57-Kan-FSH-BIA/ *AbsI* и *NheI*; pUC57-Kan-FSH-BIA/ *AbsI* и *SpeI*; pUC57-Kan-FSH-AIB/ *AbsI* и *SpeI*, соответственно [13].

Использовали линию клеток китайского хомячка CHO DG-44 [14], дефектных по гену *DHFR*, адаптированные к суспензионному культивированию в бессывороточной среде определенного химического состава (Invitrogen, США). Клетки выращивали в колбах Эрленмейера объемом 125 мл (VWR Scientific, США) в 30 мл

Название олигонуклеотида	Последовательность (5'-3')
AS-LH-4F	TTC CTC GAG GCC GCC ACC ATG GA
AS-LH-3F	GGC CGC CAC CAT GGA GAT GCT GCA GGG CCT CTT GCT CTT ACT TCT ACT GAG TAT GGG TGG GGC CTG GGC TTC TCG GGA ACC TCT ACG T
AS-LH-2F	TTC TCG GGA ACC TCT ACG TCC TTG GTG CCA TCC GAT CAA CGC AAT TCT GGC AGT TGA GAA GGA AGG CTG TCC TGT GTG CAT AAC AGT C
AS-LH-1F	TGT CCT GTG TGC ATA ACA GTC AAT ACC ACA ATT TGT GCA GGC TAC TGC CCA ACT ATG ATG AGG GTG TTG CAG GCT GTT CTT CCT CCC C
AS-LH-1R	CCT CTG GGG CAG CCA GGC AGT CTG ATT GAC TCA AAT CTC ACG TCG CGA TAG GTG CAC ACG ACT TGA GGC AGG GGA GGA AGA ACA GCC T
AS-LH-2R	TCA CTA GTG CTT CGC CTA CAT GGT CCA CAG CGA CAG GAC AGT GCA ACA GGG AAT GAC ACA ACA GGA TCG ACA CCT CTG GGG CAG CCA G
AS-LH-3R	AGA GAA ACA AGA GGC CAG AAA GCT GTG GGT GGT CAC AGG TCA GTG GGT GAT CTT TGG GTC CTC CGC AAT CAC TAG TGC TTC GCC TAC A
AS-LH-4R	ATG CTA GCT CAG AGA AAC AAG AGG CCA GAA A

Таблица 1. Праймерные олигонуклеотиды для создания синтетического гена бета-субъединицы ЛГ.

Table 1. Oligonucleotides for the synthesis of the LH beta-subunit gene.

сред FreeStyle™ CHO Expression Medium (Invitrogen, США) и ProCHO™-5 (Lonza, Швейцария) с добавлением 0,1% Anticlumping agent (Thermo Fisher Scientific, США) в CO₂-инкубаторе (37° C, 8% CO₂ для FreeStyle™ CHO Expression Medium и 5% CO₂ для ProCHO™-5) при перемешивании на орбитальной качалке с постоянной скоростью 130 об/мин. Клетки пассировали каждые 2-3 дня по достижении культурой плотности 1,2×10⁶ живых клеток в 1 мл. Трансфекцию проводили на аппарате Neop, используя установки 1700 В, 1 импульс 20 мс, набор для нуклеофекции Invitrogen Neop (Invitrogen) и по 9 мкг линейаризованной плазмидной ДНК на 1×10⁶ клеток. Для контроля эффективности трансфекции к целевой ДНК добавляли по 1,5 мкг сверхскрученной плазмиды pCMV-EGFP-N2, кодирующей зеленый флуоресцентный белок, под контролем вирусного промотора CMV. Клетки культивировали в течение 48 часов без смены среды, после чего микроскопически определяли долю трансфицированных клеток, экспрессирующих eGFP, и уровень секреции ЛГ методом ИФА и переводили в среду для селекционного культивирования, не содержащую гипоксантина, тимидина и глутамина и дополнительно содержащую 200 нМ метотрексата (Sigma-Aldrich, США) и 50 нМ метионилсульфоксимиона (Sigma-Aldrich, США). Вели культивирование в течение 20-30 дней до восстановления жизнеспособности более 85% клеток, заменяя культуральную среду на 90% каждые 3-4 дня.

Иммуноферментный анализ проводили по схеме sandwich ELISA. В качестве калибратора использовали препарат Луверис (Мерк Сероно, Италия) с начальной концентрацией 4 нг/мл. Использовали мышинные моноклональные антитела против β-LH в PBS pH = 7,2 (Хема-Медика, Россия), конъюгат против

α-субъединицы ЛГ, ХГЧ, ФСГ, ТТГ с пероксидазой хрена в PBS pH 7,2.

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) для анализа копияности экспрессионной кассеты в геноме проводили на амплификаторе iCycler iQ (Bio-Rad, США). Использовали реакционную смесь: qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) и праймеры, приведенные в **таблице 2**. Каждую реакцию повторяли 3 раза в объеме 25 мкл, в 3-5 повторах.

Геномную ДНК выделяли набором «Wizard SV Genomic DNA Purification System» (Promega, США). Концентрацию ДНК измеряли при помощи компактного флуориметра Qubit и наборов Quant-iT™ DNA BR Assay Kit и Quant-iT™ DNA HS (Invitrogen, США). Для анализа брали 5 нг геномной ДНК в 5 мкл на точку.

Данные ПЦР-РВ обрабатывали в программе iCycler Iq4, включая расчет эффективности реакций. Копийность экспрессионной кассеты в геноме определяли из калибровочной кривой, построенной для серийных разведений плазмид p1.1-A1B для анализа копияности генов альфа-цепи и DHFR, p1.2-GS-Bch для анализа копияности генов бета-цепи и GS, p-Gem-Rab1 для анализа копияности гена сравнения [13]. Результаты ПЦР сравнивали с результатами для контрольного ампликона Rab, представленного в геноме клеток CHO только один раз, по поисковой выдаче алгоритма BLAST из базы данных NCBI Nucleotide Collection.

Результаты

Для получения стабильно трансфицированных линий клеток были созданы плазмиды p1.1-LH-α и p1.2-GS-LH-α, кодирующие альфа-субъединицу ЛГ и гены устойчивости DHFR и GS, соответственно, а также плазмиды p1.1-LH-β и p1.2-GS-LH-β, кодирующие

Название олигонуклеотида	Последовательность (5'-3')
RT-LH-F	GCC TCT TGC TCT TAC TTC TAC
RT-LH-R	AAT TGT GGT ATT GAC TGT TAT GC
SQ-FA-F	CAC GCT ACA GGA AAA CCC
SQ-FB-F	GCC CAA AAT CCA GAA AAC
SQ-FA-R	TCT TGG ACC TTA GTG GAG TG
SQ-FB-R	ACA ATC AGT GCT GTC GCT
RT-ID-F	GCC ACA AGA TCT GCC ACC ATG
RT-ID-R	GTA GGT CTC CGT TCT TGC CAA TC
RT-RAB-F	GAG TCC TAC GCT AAT GTG AAA C
RT-RAB-R	TTC CTT GGC TGT GGT GTT G

Таблица 2. Праймерные олигонуклеотиды для ПЦР-РВ.

Table 2. Oligonucleotides for RT-PCR.

бета-субъединицу ЛГ (**рис. 1Б**). Отсутствие мутаций в областях открытых рамок считывания целевых генов было подтверждено секвенированием. Для ко-трансфекций плазмиды с совместимыми селекционными маркерами были сгруппированы в 2 пары – р1.1-LH- α , р1.2-GS-LH- β (LHA) и р1.1-LH- β , р1.2-GS-LH- α (LHB). Основные параметры временно и стабильно трансфицированных популяций, полученных для родительских клеток CHO DG-44, приведены в **таблице 3**. При сходной эффективности трансфекции для обеих пар плазмид наблюдались большие различия в титре секретированного ЛГ при транзиторной трансфекции – для пары плазмид LHA удельный титр целевого белка был в 16 раз выше, чем для пары LHB, однако в случае стабильно трансфицированных популяций клеток, полученных в присутствии 500 нМ MTX и 50 нМ MSX, различие в удельной продуктивности культур уменьшилось до трехкратного. Поскольку популяция клеток, стабильно трансфицированных парой плазмид LHB, обладала большей скоростью удвоения, она была использована для дальнейших опытов по амплификации генов субъединиц ЛГ в геноме клеток-продуцентов.

При первичной селекции стабильно трансфицированных популяций клеток для уменьшения времени селекции была использована очень низкая концентрация ингибитора глутаминсинтазы MSX, поэтому была исследована возможность амплификации или вторичной селекции клеток в поликлональной популяции с концентрацией MSX, увеличенной до 25 мкМ, при одновременном увеличении концентрации MTX до 500 нМ. Обнаружено, что одновременное увеличение концентраций двух селекционных агентов MSX и MTX дает меньший прирост копийности целевых генов по сравнению с увеличением концентрации одного MTX (**рис. 2А**); достоверного изменения удельной продуктивности клеток при этом также не наблюдалось (данные не приводятся).

Дальнейшую амплификацию целевых генов в поликлональной культуре вели путем последовательного повышения концентрации MTX при постоянной концентрации MSX 50 нМ (**рис. 2Б**). После проведения четырех шагов амплификации при конечной концентрации MTX 8 мкМ была получена популяция клеток с удельной продуктивностью 2,2 пг/клетка. Данный уровень продукции ЛГ потенциально достаточен для последую-

Пара плазмид	LHA	LHB
Эффективность трансфекции (%)	20	46
Титр ЛГ через 48 часов после трансфекции (нг/мл)	0,8	17
Продуктивность популяций клеток через 48 часов после трансфекции (нг/10 ⁶ клеток)	4,9	180
Удельная продуктивность в стабильно трансфицированных популяциях (пг/клетка/день)	0,297	0,103
Время удвоения клеток (час)	48,5	37

Таблица 3. Основные параметры популяций клеток, трансфицированных парами плазмид LHA и LHB.

Table 3. Major parameters of the cell populations, transfected with plasmide pairs LHA and LHB.

щего получения клональных линий с удельной продуктивностью 5-10 пг/клетка/день; такие клональные линии могут быть использованы для экономически обоснованного производства рекомбинантного ЛГ человека. Для полученной поликлональной популяции был проведен анализ распределения субъединиц ЛГ в культуральной среде между гетеродимером ЛГ и свободной формой методом иммуноблоттинга. В случае бета-субъединицы ЛГ около половины иммунореактивного материала находилось в форме гетеродимера (рис. 3), при этом в препарате сравнения Луверис также выявлялось некоторое количество бета-субъединицы ЛГ в свободной форме. Таким образом, полученная популяция клеток секретировала смесь гетеродимерного ЛГ и свободной бета-субъединицы ЛГ.

Необходимо отметить, что изменения копийности целевых генов субъединиц ЛГ и генов селекционных маркеров в геноме клеток-продуцентов почти не коррелировали с ростом наблюдаемой продуктивности клеток; при этом в процессе амплификации наблюдался линейный рост копийности гена селекционного маркера GS, на который не оказывалось возрастающего давления; и только для последнего шага амплификации был зафиксирован значительный рост копийности гена бета-субъединицы ЛГ и связанного с ним гена DHFR. По-видимому, в изучаемой поликлональной популяции клеток в процессе геномной амплификации возникали различные субпопуляции, в которых повышение уровня экспрессии гена DHFR происходило различными способами, например, у части клеток могла происходить амплификация копий целевых генетических конструкций, интегрированных в активно транскрибирующиеся участки генома при одновременной потере слабо транскрибирующихся копий целевых генов. Другим возможным объяснением наблюдаемой динамики копийности целевых генов и маркеров может быть появление небольших по численности субпопуляций клеток с высоким уровнем секреции ЛГ и высокой копийностью целевых генов.

Для дискриминации данных гипотез нами было проведено клонирование клеток из первичной стабильно трансфицированной популяции, отбор нескольких наиболее продуктивных клонов и проведение одного шага амплификации для этих клонов. Были отобраны 6 клонов клеток с максимальной продуктивностью, результаты измерения динамики их продуктивности и копийности целевых генов приведены на рисунке 4. Только для одного из шести клонов клеток наблюдался существенный рост продуктивности, при этом

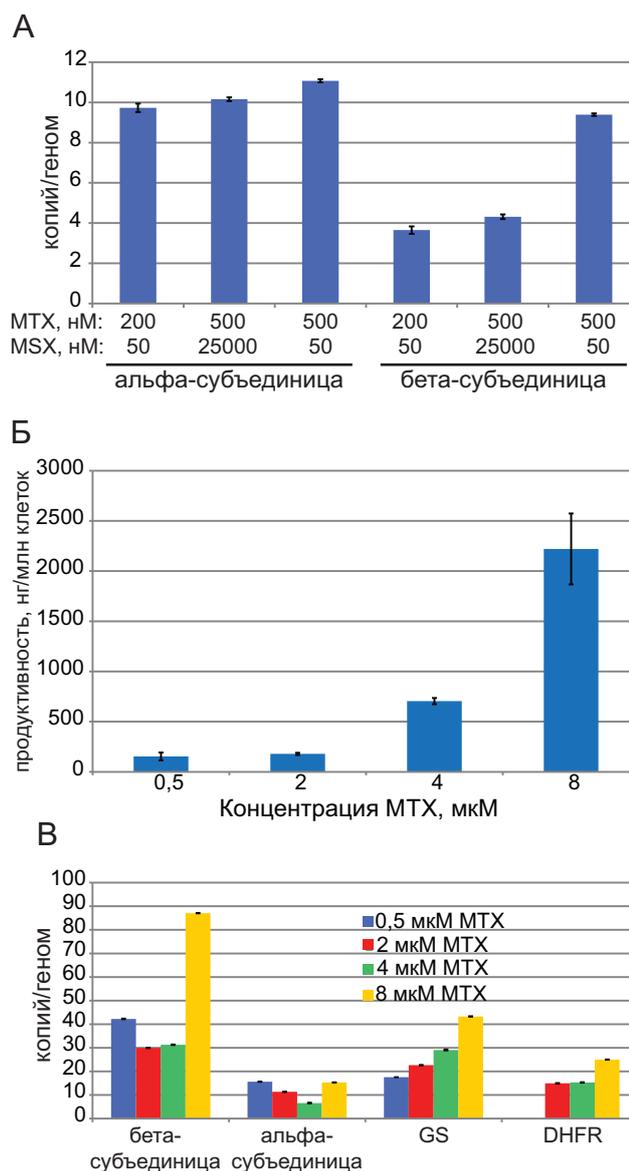


Рисунок 2. Динамика копийности генов альфа- и бета-субъединиц лютеинизирующего гормона в геноме стабильно трансфицированных клеток CHO и продуктивность популяций клеток при увеличении концентрации MTX и MSX.

(А) Динамика копийности генов при одновременном повышении уровней MTX и MSX.

(Б) Изменение продуктивности клеток при последовательном повышении концентрации MTX.

(В) Зависимость копийности генетических конструкций в геноме от концентрации MTX методом ПЦР-РВ.

Данные приведены как среднее, $n = 3-4$ для ПЦР-РВ, $n = 2$ для ИФА, планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению.

Figure 2. Gene copy numbers of alpha and beta subunits of luteinizing hormone in the genome of stably transfected CHO cells and cells population productivity at increasing concentrations of MTX and MSX.

(A) The number of gene copies as it changes with increasing concentrations of MTX and MSX.

(B) Changes in the cell productivity with increasing concentrations of MTX.

(B) The number of copies of genetic constructs in the genome as it changes with increasing concentrations of MTX (detected with RT-PCR).

The mean values are presented, $n = 3-4$ for RT-PCR, $n = 2$ for ELISA, the error bars depict the standard deviations.

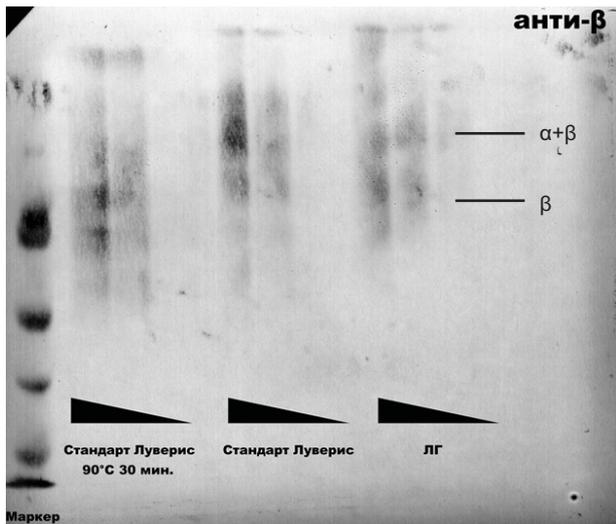


Рисунок 3. Иммуноблоттинг с антителами к бета-субъединице секретируемого лютеинизирующего гормона человека для поликлональной популяции клеток после амплификации под действием МТХ. Расположение дорожек: 1 – маркер, 2-3 – 4 нг и 2 нг Луверис после 30 минут инкубации при +95°С; 4-5 – 4 нг и 2 нг Луверис без нагревания; 6-8 – 4 нг, 2 нг и 1 нг ЛГ в кондиционированной среде, без нагревания. Молекулярные массы указаны в кДа.

Figure 3. Immunoblotting with antibodies to the beta subunit of human luteinizing hormone secreted by a polyclonal population of cells after the MTX-induced amplification. Track identification (left to right): 1 – marker, 2-3 – 4 ng and 2 ng Luveris after 30 minutes incubation at +95°С; 4-5 – 4 ng and 2 ng Luveris without heating; 6-8 – 4 ng, 2 ng and 1 ng LH in conditioned medium, without heating. Molecular masses are expressed in kDa.

увеличение копийности обоих целевых генов было зафиксировано не только для этого клона клеток, но и для клона «2».

Поскольку для выбранных шести клонов при одном шаге геномной амплификации выявлялась разнонаправленная динамика как продуктивности клеток, так и копийности целевых генов, можно предположить, что в поликлональной популяции клеток происходят аналогичные процессы, и общее повышение продуктивности клеток соответствует сильному повышению продуктивности в небольшой части клеток и отсутствию динамики продуктивности в большей части клеток. Вследствие этого раздельная геномная амплификация для клональных клеточных линий не дает существенных преимуществ по сравнению с ведением геномной амплификации в поликлональной популяции, последующему разделению клональных линий и их анализу.

Заключение

Для двух пар генетических конструкций, кодирующих гены цепей ЛГ человека, сцепленные с маркерами устойчивости DHFR и GS, были получены стабильно

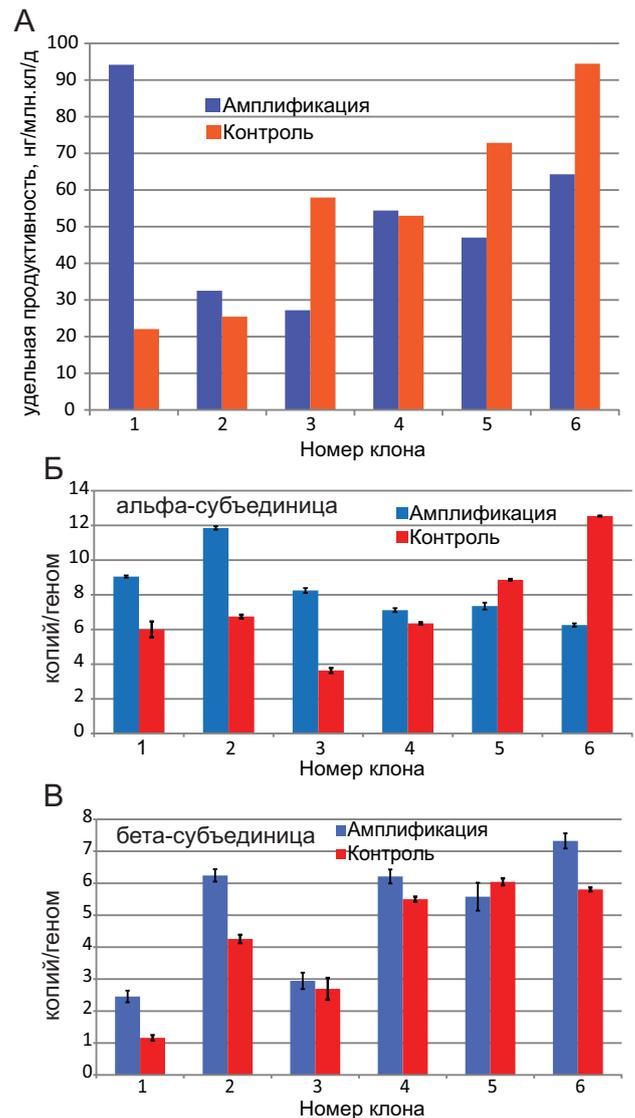


Рисунок 4. Изменение продуктивности клеток и копийности целевых генов в геноме клеток при геномной амплификации клональных клеточных линий.

(А) – продуктивность клеток по ИФА; (Б) – копийность гена альфа-субъединицы ЛГ; (В) – копийность гена бета-субъединицы ЛГ.

Данные приведены как среднее, n = 3-4 для ПЦР-РВ, n = 2 для ИФА, планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению.

Figure 4. Changes in the cell productivity and the number of target genes copies without and with the genomic amplification of clonal cell lines.

(А) – cell productivity as tested with ELISA; (Б) – the number of gene copies of the LH alpha-subunit gene; (В) – the number of gene copies of the LH beta-subunit gene.

The mean values are presented, n = 3-4 for RT-PCR, n = 2 for ELISA, the error bars depict the standard deviations.

трансфицированные популяции клеток CHO с удельной продуктивностью 0,3 пг/клетка/день для комбинации генетических конструкций, в которой ген цепи альфа был связан с маркером устойчивости DHFR (популяция LHA), и 0,1 пг/клетка/день для комбинации

ции, в которой ген цепи альфа был связан с маркером устойчивости GS (популяция LHB). Для поликлональной популяции клеток LHB была проведена амплификация целевых генов в геноме под действием возрастающих концентраций МТХ, и было установлено, что продуктивность клеток многократно возрастает при увеличении концентрации МТХ до 8 мкМ.

Таким образом, нами была продемонстрирована возможность ко-ампликации пары генов, сцепленных с различными селекционными маркерами в составе векторных плазмид семейства p1.1 и ко-трансфицированных в клетки CHO. Для клональных клеточ-

ных линий, полученных из популяции LHB, был продемонстрирован рост продуктивности у одной из шести исследованных линий в ответ на добавление возрастающих концентраций метотрексата. Можно заключить, что ко-амплификация пары целевых генов в геноме клеток-продуцентов является достаточно частым событием для выбранных нами векторных плазмид. В результате выполнения работы были получены различные клеточные линии, секретирующие рекомбинантный ЛГ человека в больших количествах (до 4 мг/л) и потенциально пригодные для создания промышленной клеточной линии-продуцента ЛГ человека.

Литература:

- Munoz E., Bosch E., Fernandez I., Portela S., Ortiz G., Remohi J., Pellicer A. The role of LH in ovarian stimulation. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012; 13 (3): 409-16.
- Leao Rde B., Esteves S.C. Gonadotropin therapy in assisted reproduction: an evolutionary perspective from biologics to biotech. *Clinics (Sao Paulo).* 2014; 69 (4): 279-93.
- Ata B., Seli E. Strategies for Controlled Ovarian Stimulation in the Setting of Ovarian Aging. *Semin Reprod Med.* 2015; 33 (6): 436-48.
- Bleau N., Agdi M., Son W., Tan S., Dahan M.H. A Comparison of Outcomes from In Vitro Fertilization Cycles Stimulated with Follicle Stimulating Hormone Plus either Recombinant Luteinizing Hormone or Human Menopausal Gonadotropins in Subjects Treated with Long Gonadotropin Releasing Hormone Agonist Protocols. *Int J Fertil Steril.* 2017; 11 (2): 79-84.
- Mullen M.P., Cooke D., Crow M. Structural and functional roles of FSH and LH as glycoproteins regulating reproduction in mammalian species. In: *Gonadotropin [Ed. J. Vizcarra]. Chapter 8. InTech: International Publisher.* 2013: 155-80.
- Воробьев И.И., Орлова Н.А., Ковнир С.В., Ходак Ю.А. Плазмида для экспрессии

- в клетках CHO рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) человека, плазмида для экспрессии в клетках CHO бета-субъединицы рекомбинантного ФСГ человека, клетка CHO – продуцент рекомбинантного ФСГ человека и способ получения указанного гормона. *Патент РФ № 2560596.* 2015; Бюл. № 23. URL: <http://www.findpatent.ru/patent/256/2560596.html> [Дата доступа: 20.05.2017].
- Orlova N.A., Kovnir S.V., Hodak J.A., Vorobiev I.I., Gabibov A.G., Skryabin K.G. Improved elongation factor-1 alpha-based vectors for stable high-level expression of heterologous proteins in Chinese hamster ovary cells. *BMC Biotechnol.* 2014; 14: 56.
- Bochkov Y.A., Palmenberg A.C. Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location. *Biotechniques.* 2006; 41 (3): 283-284, 286, 288 passim.
- Almo S.C., Love J.D. Better and faster: improvements and optimization for mammalian recombinant protein production. *Curr Opin Struct Biol.* 2014; 26: 39-43.
- Jazayeri S.H., Amiri-Yekta A., Gourabi H., Abd Emami B., Halfinezhad Z., Abolghasemi S. et al. Comparative Assessment on the Expression Level of Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone (FSH) in Serum-Containing Versus

Protein-Free Culture Media. *Mol Biotechnol.* 2017; 37 (4): 1-9. DOI: 10.1007/s12033-017-0037-4.

- Nakamura Y., Gojbori T., Ikemura T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28 (1): 292.
- Kovnir S.V., Orlova N.A., Khodak C. et al. Approaches to Controlled Co-Amplification of Genes for Production of Biopharmaceuticals: Study of the Insertion and Amplification Dynamics of Genetic Cassettes in the Genome of Chinese Hamster Ovary Cells during Co-Expression of Compatible Pair of Plasmids. *Bull Exp Biol Med.* 2017; 163 (2): 245-9.
- Ковнир С.В., Орлова Н.А., Воробьев И.И. и др. Плазмида для экспрессии рекомбинантного фактора свёртываемости крови IX человека, клетка CHO – продуцент рекомбинантного фактора свёртываемости крови IX человека и способ получения указанного фактора. *Патент РФ № 2585532.* 2015; Бюл. № 15. URL: <https://evid.ru/rid/216.015.4457.html> [Дата доступа: 20.05.2017].
- Urra G., Kas E., Carothers A.M., Chasin L.A. Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. *Cell.* 1983; 33 (2): 405-12.

References:

- Munoz E., Bosch E., Fernandez I., Portela S., Ortiz G., Remohi J., Pellicer A. The role of LH in ovarian stimulation. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012; 13 (3): 409-16.
- Leao Rde B., Esteves S.C. Gonadotropin therapy in assisted reproduction: an evolutionary perspective from biologics to biotech. *Clinics (Sao Paulo).* 2014; 69 (4): 279-93.
- Ata B., Seli E. Strategies for Controlled Ovarian Stimulation in the Setting of Ovarian Aging. *Semin Reprod Med.* 2015; 33 (6): 436-48.
- Bleau N., Agdi M., Son W., Tan S., Dahan M.H. A Comparison of Outcomes from In Vitro Fertilization Cycles Stimulated with Follicle Stimulating Hormone Plus either Recombinant Luteinizing Hormone or Human Menopausal

- Gonadotropins in Subjects Treated with Long Gonadotropin Releasing Hormone Agonist Protocols. *Int J Fertil Steril.* 2017; 11 (2): 79-84.
- Mullen M.P., Cooke D., Crow M. Structural and functional roles of FSH and LH as glycoproteins regulating reproduction in mammalian species. In: *Gonadotropin [Ed. J. Vizcarra]. Chapter 8. InTech: International Publisher.* 2013: 155-80.
- Vorobiev I.I., Orlova N.A., Kovnir S.V., Khodak Yu.A. Plasmid for expression in CHO cells of recombinant human follicle stimulating hormone (FSH), a plasmid for expression in CHO cells of the beta subunit of recombinant human FSH, a CHO-producer of recombinant human FSH, and a method for producing said hormone [Plazmida dlya ekspressii v kletkah SNO reкомбинантного фолликулостимулирующего гормона (FSG) cheloveka, plazmida dlya ekspressii v kletkah

- SNO beta-sub*edinicy reкомбинантного FSG cheloveka, kletka SNO – producent reкомбинантного FSG cheloveka i sposob polucheniya ukazannogo gormona]. *Patent RF № 2560596.* 2015; Byul. № 23. URL: <http://www.findpatent.ru/patent/256/2560596.html> (in Russian) [Accessed: 20.05.2017].
- Orlova N.A., Kovnir S.V., Hodak J.A., Vorobiev I.I., Gabibov A.G., Skryabin K.G. Improved elongation factor-1 alpha-based vectors for stable high-level expression of heterologous proteins in Chinese hamster ovary cells. *BMC Biotechnol.* 2014; 14: 56.
- Bochkov Y.A., Palmenberg A.C. Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location. *Biotechniques.* 2006; 41 (3): 283-284, 286, 288 passim.

9. Almo S.C., Love J.D. Better and faster: improvements and optimization for mammalian recombinant protein production. *Curr Opin Struct Biol.* 2014; 26: 39-43.
10. Jazayeri S.H., Amiri-Yekta A., Gourabi H., Abd Emami B., Halfinezhad Z., Abolghasemi S. et al. Comparative Assessment on the Expression Level of Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone (FSH) in Serum-Containing Versus Protein-Free Culture Media. *Mol Biotechnol.* 2017; 37 (4): 1-9. DOI: 10.1007/s12033-017-0037-4.
11. Nakamura Y., Gojobori T., Ikemura T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28 (1): 292.
12. Kovnir S.V., Orlova N.A., Khodak C. et al. Approaches to Controlled Co-Amplification of Genes for Production of Biopharmaceuticals: Study of the Insertion and Amplification Dynamics of Genetic Cassettes in the Genome of Chinese Hamster Ovary Cells during Co-Expression of Compatible Pair of Plasmids. *Bull Exp Biol Med.* 2017; 163 (2): 245-9.
13. Kovnir S.V., Orlova N.A., Vorobiev I.I. et al. Plasmid for expression of recombinant factor IX blood coagulability, CHO cell – producer of recombinant factor IX blood coagulability and the method of obtaining this factor [Plazmida dlya ekspressii rekombinantnogo faktora svyortyvaemosti krovi IX cheloveka, kletka SNO – producent rekombinantnogo faktora svyortyvaemosti krovi IX cheloveka i sposob polucheniya ukazannogo faktora]. *Patent RF* № 2585532. 2015; Byul. № 15. URL: <https://edrid.ru/rid/216.015.4457.html> (in Russian) [Accessed: 20.05.2017].
14. Urlaub G., Kas E., Carothers A.M., Chasin L.A. Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. *Cell.* 1983; 33 (2): 405-12.

Сведения об авторах:

Надежда Александровна Орлова – к.б.н., научный сотрудник лаборатории биоинженерии клеток млекопитающих ФГУ «ФИЦ «ФОБ» РАН». Адрес: пр. 60-летия Октября, 7, корп. 1, Москва, Россия, 117312. E-mail: nobiol@gmail.com.

Сергей Владимирович Ковнир – к.б.н., научный сотрудник лаборатории биоинженерии клеток млекопитающих ФГУ «ФИЦ «ФОБ» РАН». Адрес: пр. 60-летия Октября, 7, корп. 1, Москва, Россия, 117312. E-mail: kovnir.serge@gmail.com.

Юлия Александровна Ходак – к.б.н., научный сотрудник лаборатории биоинженерии клеток млекопитающих ФГУ «ФИЦ «ФОБ» РАН». Адрес: пр. 60-летия Октября, 7, корп. 1, Москва, Россия, 117312. E-mail: salix@gmail.com.

Михаил Александрович Ползиков – к.х.н., генеральный директор ООО «АйВиФарма». Адрес: Научный проезд, 20, стр. 2, Москва, Россия, 117246. E-mail: mikhail.polzikov@gmail.com.

Воробьев Иван Иванович – к.х.н., доцент, зав. лабораторией биоинженерии клеток млекопитающих ФГУ «ФИЦ «ФОБ» РАН». Адрес: пр. 60-летия Октября, 7, корп. 1, Москва, Россия, 117312. E-mail: ptichman@gmail.com.

About the authors:

Nadezhda Alexandrovna Orlova – PhD, Research Associate, Laboratory of Bioengineering of Mammalian Cells, FRC FB RAS. Address: pr. 60-letiya Oktyabrya, 7, korp. 1, Moscow, Russia, 117312. E-mail: nobiol@gmail.com.

Sergey Vladimirovich Kovnir – PhD, Research Associate, Laboratory of Bioengineering of Mammalian Cells, FRC FB RAS. Address: pr. 60-letiya Oktyabrya, 7, korp. 1, Moscow, Russia, 117312. E-mail: kovnir.serge@gmail.com.

Yulia Alexandrovna Khodak – PhD, Research Associate, Laboratory of Bioengineering of Mammalian Cells, FRC FB RAS. Address: pr. 60-letiya Oktyabrya, 7, korp. 1, Moscow, Russia, 117312. E-mail: E-mail: salix@gmail.com.

Mikhail Alexandrovich Polzikov – PhD, General Director of IVFarma LLC. Address: Nauchnyi proezd, 20, str. 2, Moscow, Russia, 117246. E-mail: mikhail.polzikov@gmail.com.

Vorobiev Ivan Ivanovich – PhD, Associate Professor, Head of Laboratory of Bioengineering of Mammalian Cells, FRC FB RAS. Address: pr. 60-letiya Oktyabrya, 7, korp. 1, Moscow, Russia, 117312. E-mail: ptichman@gmail.com.

Работа выполнена при поддержке РФФИ 16-34-01026 и 16-34-60242.