

ВЫБОР КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО Фолликулостимулирующего ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА

В.С. Монахова

биолог,

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» (Санкт-Петербург)

E-mail: v.s.monakhova@hpb.spb.ru

Н.В. Пигарева

к.м.н., вед. биолог,

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» (Санкт-Петербург)

А.С. Симбирцев

чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор, науч. руководитель,

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» (Санкт-Петербург)

Фолликулостимулирующий гормон – это один из важнейших гормонов репродуктивной системы человека, который широко используется во вспомогательных репродуктивных технологиях. Выбор штамма-производителя рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека (рЧФСГ) одна из ключевых задач биотехнологического процесса.

Цель работы. Целью работы являлось получение стабильной клеточной линии, продуцирующей рЧФСГ, с использованием двух различных родительских клеточных линий *CHO*.

Материалы и методы. Для получения стабильных клонов, продуцирующих рЧФСГ, были использованы две клеточные линии – *CHO-K1* и *CHO-DXB 11*, адаптированные к культивированию в бессывороточной среде. Подсчет клеток и оценку клеточной жизнеспособности осуществляли с помощью окраски трипановым синим. Концентрацию рЧФСГ определяли методом иммуоферментного анализа, подлинность белка определяли методом вестерн-блоттинга.

Результаты. Четыре наиболее продуктивных клона, полученные с использованием клеточной линии *CHO-DXB 11*, были отобраны после трех этапов скрининга – отбор пула, селекция клонов и амплификация с использованием метотрексата. Наибольшей продуктивностью в течение 6 дней культивирования обладал клон *CHO-FSH 11/24* – $7,1 \pm 0,6$ мг/л. Три клона были выбраны после трансфекции и отбора клонов с использованием клеточной линии *CHO-K1*. Клон *CHO-FSH 91* обладал наибольшей продуктивностью после 6 дней культивирования – $10,8 \pm 0,9$ мг/л. Молекулярные массы препаратов рЧФСГ, полученных от разных клеточных линий-производителей, совпадали с молекулярной массой коммерческого препарата «Гонал Ф» (Merck Serono).

Выводы. Производитель, полученный с помощью клеточной линии *CHO-K1*, будет использован для дальнейших экспериментов.

Ключевые слова: штамм-производитель, фолликулостимулирующий гормон человека, суспензионные клеточные линии *CHO*.

Для цитирования: Монахова В.С., Пигарева Н.В., Симбирцев А.С. Выбор клеточной линии для получения штамма-производителя рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020;23(3): 3–7. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-03-01>

Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) представляет собой гетеродимер, состоящий из нековалентно связанных цепей – α и β . Он относится к семейству гормонов-гликопротеинов и регулирует репродуктивную функцию. ФСГ у женщин стимулирует выработку стероидов и отвечает за созревание фолликулов, у мужчин – регулирует сперматогенез.

Первые препараты ФСГ, полученные из мочи менопаузальных женщин, появились в середине XX века. Они отличались низкой степенью чистоты и содержали значительные количества лютеинизирующего гормона (ЛГ), сходного по строению

с ФСГ. С появлением хроматографии с использованием высокоаффинных антител к ФСГ удалось снизить количество ЛГ в препаратах, но они по-прежнему содержали некоторое количество мочевых белков [1]. Вследствие этого для получения ФСГ стали применять рекомбинантные технологии, позволяющие достигнуть максимальной воспроизводимости процесса и высокой степени чистоты препарата.

В клинических целях в настоящее время применяют коммерческий препарат «Гонал Ф» производства Merck Serono (Италия). Срок действия большинства патентов на препарат истек. Это от-

крывает возможность для создания его биоаналогов. Разработка и появление на рынке отечественных препаратов-дженериков позволят повысить доступность препарата для пациентов и снизить зависимость отечественной медицины от зарубежных поставок фармацевтических препаратов.

Рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон человека (рчФСГ) получают в клетках яичника китайского хомячка *CHO*. Первоначально продуцентов получали в адгезионных клеточных линиях *CHO* [2, 3], применяя фетальную сыворотку коров, которая может быть потенциальным источником прионных заболеваний и не имеет химически определенного состава. В работах [4, 5] штаммы-продуценты рчФСГ были получены в адгезионных клетках, а культивирование клеток с целью наработки белка осуществляли в суспензионных условиях. Потенциальными недостатками данного способа культивирования могут быть чувствительность клеток к перемешиванию и необходимость использования микроносителей.

Использование суспензионных культур *CHO* упрощает работу при масштабировании процесса, позволяет достигнуть высокой волюметрической продуктивности штамма. Создание высокопродуктивных продуцентов рчФСГ является актуальной задачей, поскольку препараты активно используются во вспомогательных репродуктивных технологиях.

Цель работы – получение штаммов-продуцентов, полученных в двух суспензионных клеточных линиях *CHO* – *CHO-K1* и *CHO-DXB 11*, и выбор штамма для последующего этапа оптимизации процесса культивирования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали две родительские линии клеток *CHO* – *CHO-K1* и *CHO-DXB 11*, дефицитная по дигидрофолатредуктазе. Ранее эти клеточные линии были адаптированы к культивированию в бессывороточных условиях в лаборатории иммунофармакологии ФГУП «ГосНИИ ОЧБ» ФМБА России. Клетки культивировали в смеси сред CDM4CHO и PF CHO (GE Healthcare) в соотношении 1:1 при 37 °С и атмосфере 5%-ного CO₂ в платах стационарно или пробирках на шейкере при 180 об/мин.

Клетки трансфецировали плазмидами, содержащими кодонно-оптимизированные нуклеотидные последовательности (НП) α - и β -цепей рчФСГ. Нуклеотидные последовательности α -цепи

находилась в векторах pTVK4d-FSHalpha и pTVK4p-FSHalpha. Первый вектор использовали для котрансфекции клеток линии *CHO-DXB 11*, он содержал селективный ген дигидрофолатредуктазы, второй – для котрансфекции клеток линии *CHO-K1*, он содержал селективный ген устойчивости к пурамицину. Вектор pTVK4n-FSHbeta, содержащий НП β -цепи и имеющий в составе ген устойчивости к неомицину, использовали для котрансфекции обеих линий.

Для проведения трансфекции клетки засеивали в 24-луночные планшеты и на следующие сутки трансфецировали с помощью полифекционного агента Turbofect (Thermo Scientific) согласно инструкции производителя. На вторые сутки после трансфекции клетки рассеивали в 50-миллилитровые пробирки для культивирования (Jet Biofil) в селективной среде с целью получения стабильных пулов. Из стабильных пулов с наибольшим уровнем волюметрической продуктивности рчФСГ отбирали клоны с помощью метода предельных разведений. Клоны, полученные из клеточной линии *CHO-DXB 11*, использовали для дальнейшей амплификации и получения конов с более высоким уровнем продукции. Наиболее продуктивные клоны, полученные от разных родительских клеточных линий, сравнивали по основным показателям – концентрации живых клеток, жизнеспособности, продуктивности. Подсчет клеток осуществляли в камере Горяева, жизнеспособность клеток оценивали по исключению трипанового синего. Содержащийся в культуральной жидкости рчФСГ исследовали на подлинность с помощью метода вестерн-блоттинга.

Концентрацию рчФСГ в культуральной жидкости (КЖ) определяли с помощью набора для иммуноферментного анализа «Гонадотропин-ФСГ» (Алкор Био). В вестерн-блоттинге для идентификации белка использовали антитела к β -цепи ФСГ, конъюгированные с пероксидазой хрена (Алкор Био). Перед разделением белка в полиакриламидном геле культуральную жидкость концентрировали с использованием ультрафильтрационных колонок Amicon Ultra-0,5 с пределом отсека 10 кДа (Merck). Препаратом сравнения являлся коммерческий препарат рчФСГ «Гонал-Ф» (Merck Serono).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения стабильных клонов продуцентов рчФСГ были выбраны векторы серии pTVK4 [6, 7]. Все векторы данной серии содержат после-

довательность UCOE, обеспечивающую повышенную частоту интеграции плазмидного вектора в транскрипционно активные сайты хроматина. Это приводит к высокому уровню и повышенной стабильности продукции целевого белка, кодируемого плазмидным вектором [8].

После трансфекции первоначально на селективной среде получали поликлональную популяцию, а затем отбирали наиболее продуктивные клоны из полученной популяции методом предельных разведений. Используемые концентрации селективных агентов (антибиотиков и метотрексата) были предварительно подобраны экспериментально.

На начальном этапе при получении поликлональной популяции клеток *CHO-DXB 11*, экспрессирующей рчФСГ, использовали селективную среду без гипоксантина и тимидина с содержанием 150 мг/л генетицина. Генетицин используется для селекции клеток, содержащих ген устойчивости к неомицину, поскольку он является его аналогом и имеет сходный механизм действия. Жизнеспособность клеток в пуле снизилась на первом пассаже до 78% и возросла до 97% на восьмом пассаже. Затем пул использовали для получения отдельных клонов-продуцентов. В процессе клонирования было отобрано четыре клоны, которые пересевали с использованием селективной среды сначала в 48-луночные платы, затем в 6-луночные и в пробирки для культивирования. При каждом пересеве оценивали волюметрическую продуктивность клонов. Полученные клоны использовали для дальнейшей амплификации с метотрексатом, с целью повышения продуктивности итогового кло-

на. Только клетки клона 24 смогли адаптироваться к метотрексату в конечной концентрации 2,5 нМ. Этот исходный клон был использован для дальнейшего субклонирования. После клонирования и трех последовательных скринингов были отобраны четыре клоны, которые наравне с исходным клоном, использовали для проведения культивирования в 50-миллилитровых пробирках для определения основных характеристик (табл. 1). Клон *CHO-FSH 11/24* был наиболее перспективным и отличался более высокой удельной и волюметрической продуктивностью по сравнению с исходным клоном *CHO-FSH 24*.

В среду для культивирования трансфицированных клеток линии *CHO-K1* добавляли селективные антибиотики – 10 мг/л пуромидина и 200 мг/л генетицина. После перевода на селективную среду в течение первых трех пассажей жизнеспособность клеток снизилась до 11,4%, затем начала повышаться и на шестом пассаже достигла 100%. После клонирования полученной клеточной популяции было отобрано 14 клонов, обладающих наибольшей продуктивностью. На последнем этапе скрининга были отобраны три клоны-продуцента рчФСГ. Их пересевали в пробирки в среду без селективных агентов для того, чтобы оценить накопление продукта в течение 6 суток культивирования. Результаты приведены в табл. 2.

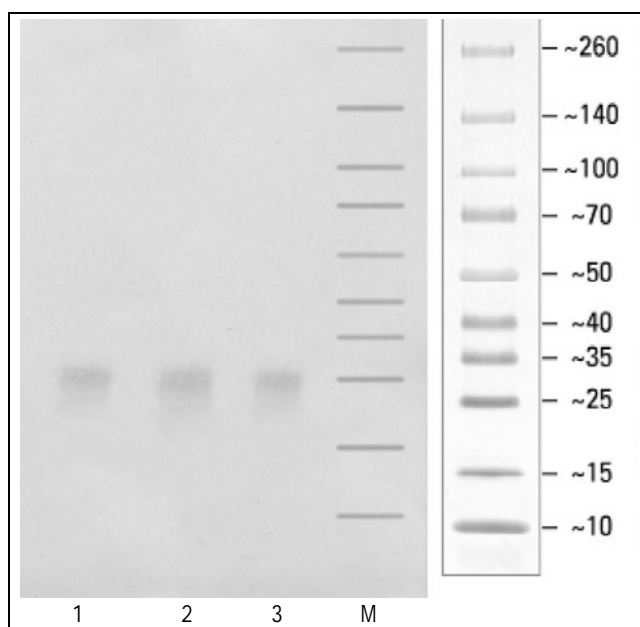
На основании полученных результатов был отобран клон 91, названный *CHO-FSH 91*, обеспечивающий накопление в культуральной жидкости $10,8 \pm 0,9$ мг/л рекомбинантного ФСГ человека на шестые сутки культивирования.

Таблица 1. Характеристики клонов-продуцентов рчФСГ, полученные с использованием клеточной линии *CHO-DXB 11*, на шестые сутки культивирования

№ клона	Волюметрическая продуктивность, мг/л	Удельная продуктивность, пг/клетку/день	Концентрация живых клеток, 10^6 кл/мл	Жизнеспособность, %
11/24	$7,1 \pm 0,6$	$0,7 \pm 0,03$	$6,5 \pm 0,6$	94 ± 2
8/24	$2,5 \pm 0,4$	$0,2 \pm 0,03$	$4,7 \pm 0,5$	91 ± 3
9/24	$1,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,01$	$3,2 \pm 0,5$	70 ± 2
10/24	$0,9 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,01$	$3,1 \pm 0,4$	80 ± 4
24	$2,41 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,01$	$3,7 \pm 0,3$	87 ± 2

Таблица 2. Характеристики клонов-продуцентов рчФСГ, полученные с использованием клеточной линии CHO-K1, на шестые сутки культивирования

№ клона	Волуметрическая продуктивность, мг/л	Удельная продуктивность, пг/кл/день	Концентрация живых клеток, 10 ⁶ кл/мл	Жизнеспособность, %
91	10,8±0,9	1,3±0,02	6,2±0,5	94±2
38	4,1±0,2	0,3±0,02	5,4±0,6	85±3
39	2,5±0,1	0,2±0,01	3,8±0,6	82±3



Вестерн-блот образцов КЖ наиболее продуктивных клонов: М – маркер молекулярных масс (Thermo Scientific), 1 - препарат «Гонал Ф», 2 – КЖ клона *CHO-FSH 91*, 3 - КЖ клона *CHO-FSH 11/24*

При сравнении характеристик наиболее продуктивных клонов, полученных из разных клеточных линий *CHO*, отмечено, что в общем случае характеристики были сходными для клонов из обеих родительских клеточных линий. Исключением являлся клон *CHO-FSH 91*, полученный из линии клеток *CHO-K1*, отличавшийся значительным приростом клеток и более высокой продуктивностью. Культуральную жидкость после 6 суток культивирования от наиболее продуктивных клонов-продуцентов из двух разных родительских линий *CHO-FSH 91* и *CHO-FSH 11/24* анализировали с помощью вестерн-блотинга.

Показано, что молекулярные массы рчФСГ, полученных от клонов-продуцентов, не отличаются друг от друга и совпадают с молекулярной массой оригинального препарата рчФСГ «Гонал Ф» (рисунок).

Использование клеточной линии *CHO-K1* в экспериментах оказалось наиболее целесообразным. Важно отметить что, клон *CHO-FSH 11/24* может быть использован для амплификации с возрастающей концентрацией метотрексата, что позволит увеличить удельную продуктивность клона.

Использование клеточной линии *CHO-K1* в экспериментах оказалось наиболее целесообразным. Важно отметить что, клон *CHO-FSH 11/24* может быть использован для амплификации с возрастающей концентрацией метотрексата, что позволит увеличить удельную продуктивность клона.

ВЫВОДЫ

1. В линиях клеток *CHO-DXB 11* и *CHO-K1* были получены штаммы-продуценты рчФСГ. Продуцент *CHO-FSH 91*, полученный в клетках линии *CHO-K1*, обладал более высокой волуметрической продуктивностью по сравнению с продуцентом *CHO-FSH 11/24*, полученным в клеточной линии *CHO-DXB 11*.
2. Подлинность белка была подтверждена с помощью вестерн-блотинга в сравнении с оригинальным препаратом.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Latash W.D., Karande V.C., Klipstein S. The development of recombinant follicle stimulating hormone (rFSH) for use in the treatment of infertility: new solutions to old challenges. *Reviews in Gynaecological Practice*. 2004; 4:203–210.
2. Keene J.L., Matzuk M.M. et al. Expression of biologically active human follitropin in chinese hamster ovary cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1989; 264(9):4769–4775.
3. Olijve W., Boer W. et al. Molecular biology and biochemistry of human recombinant follicle stimulating hormone (Puregon®). *Molecular Human Reproduction*. 1996; 2(5):371–382.
4. NA K.H., Seo K.S., Kim W.B., Kim S.-Ch., Lee S.-H., Lee K.S. Purification and Characterization of Recombinant Human Follicle Stimulating Hormone Produced by Chinese Hamster Ovary Cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2005; 15(2):395–402.
5. Kim D.J., Seok S.-H., Baek M.-W., Lee H.-Y., Juhn J.-H., Lee S. et al. Highly expressed recombinant human follicle-stimulating

hormone from Chinese hamster ovary cells grown in serum-free medium and its effect on induction of folliculogenesis and ovulation. 2010; 93(8):2652–2660.

6. Патент № 2615447 (РФ). Синтетическая ДНК, кодирующая интерлейкин-7 человека, содержащий ее экспрессионный вектор (варианты), штамм-продуцент интерлейкина-7 человека и способ получения интерлейкина-7 человека. Ищенко А.М., Кудлинг Т.В., Петров А.В., Пигарева Н.В., Протасов Е.А., Симбирцев А.С. 2017. (Patent № 2615447 (RF). Sinteticheskaya DNK, kodiruyushchaya interlejkin-7 cheloveka, sodержashchij ee ekspressionnyj vektor (varianty), shtamm-producent inter-lejkina-7 cheloveka i sposob polucheniya interlejkina-7 cheloveka. Ishchenko A.M., Kudling T.V., Petrov A.V., Pigareva N.V., Protasov E.A., Simbircev A.S. 2017).
7. Патент № 2616273 (РФ). Синтетическая ДНК, кодирующая антимюллеров гормон человека, содержащий ее экспрессионный вектор pTVK4pu/MISOPT и штамм

клеток яичников китайского хомячка CHO-MIS – продуцент рекомбинантного антимюллерового гормона человека. Петров А.В., Карасев М.М., Кудлинг Т.В., Пигарева Н.В., Сергеева В.Е., Трофимов А.В., Ищенко А.М., Горбунов А.А., Вахрушев А.В., Симбирцев А.С. 2017. (Sinteticheskaya DNK, kodiruyushchaya antimyullerov gormon cheloveka, sodержa-shchij ee ekspressionnyj vektor pTVK4pu/MISOPT i shtamm kletok yaichnikov kitajskogo homyachka CHO-MIS – producent rekombinantnogo antimyullerovogo gormona cheloveka. Patent № 2616273 (RF). Petrov A.V., Karasev M.M., Kudling T.V., Pigareva N.V., Sergeeva V.E., Trofimov A.V., Ishchenko A.M., Gorbunov A.A., Vahrushev A.V., Simbircev A.S. 2017).

8. Betts Z., Dickson A.J. Ubiquitous Chromatin Opening Elements (UCOEs) effect on transgene position and expression stability in CHO cells following methotrexate (MTX) amplification. Biotechnol J. 2016; 11(4):554–641.

Поступила после доработки 27 января 2020 г.

CHO CELL LINE SELECTION FOR DEVELOPMENT OF STABLE CELL LINE PRODUCING RECOMBINANT HUMAN FOLLICLE-STIMULATING HORMONE

© Authors, 2020

V.S. Monakhova

Biologist,

FGUP «State Research Institute of Highly Pure Biopreparations» of the Federal Biomedical Agency (Saint-Petersburg)

E-mail: v.s.monakhova@hpb.spb.ru

N.V. Pigareva

Ph.D. (Med.), Senior Biologist,

FGUP «State Research Institute of Highly Pure Biopreparations» of the Federal Biomedical Agency (Saint-Petersburg)

A.S. Simbirtsev

Corresponding member of RAS, Dr.Sc. (Med.), Professor, Scientific Supervisor,

FGUP «State Research Institute of Highly Pure Biopreparations» of the Federal Biomedical Agency (Saint-Petersburg)

Follicle-stimulating hormone (FSH) is one of the most important hormones of reproductive system and it is widely used as a treatment in an assisted reproductive technology. Choice of productive cell line for recombinant human FSH (rhFSH) protein production is the major issue of biotechnological process.

Study objective. The aim of the study was to generate stable cell lines for rhFSH production using different parental *CHO* cell lines and compare their characteristics.

Material and methods. Two *CHO* suspension parental cell lines were used for stable cell line generation – *CHO-K1* and *CHO-DXB 11* adapted to suspension conditions. Cell count and viability were analyzed by trypan blue exclusion method. RhFSH concentration was measured by ELISA, protein identity was confirmed by western blot analysis.

Results. Four clones generated from *CHO-DXB 11* cell line were selected after 3 steps – pool selection, clone selection and methotrexate amplification. Productivity during 6 days of cultivation for the most productive clone *CHO-FSH 11/24* was $7,1 \pm 0,6$ mg/l. Three clones were chosen after transfection and cell cloning of *CHO-K1* cells transfected with plasmids containing of FSH α - and β -chains sequences. The highest productivity was detected for *CHO-FSH91* clone and it was $10,8 \pm 0,9$ mg/l. Molecular weight of rhFSH was identical for rhFSH purified from cell culture of optimal clones and commercial preparation Gonal-F (Merck Serono).

Key words: *CHO-FSH91* clone which was generated from *CHO-K1* cell line was chosen for the further experiments.

For citation: Monakhova V.S., Pigareva N.V., Simbirtsev A.S. CHO cell line selection for development of stable cell line producing recombinant human follicle-stimulating hormone. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020;23(3):3–7. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-03-01>