

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Государственный научно-исследовательский институт
генетики и селекции промышленных микроорганизмов».
Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт»**

На правах рукописи

Воробьева Ива Глебовна

**РАЗРАБОТКА МАРКЕРА СЕЛЕКЦИИ И СОРТИНГА ДЛЯ
БЫСТРОГО ПОЛУЧЕНИЯ КЛОНАЛЬНЫХ ЛИНИЙ С
ПЛАНИРУЕМОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ
РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА**

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Научный руководитель
кандидат биологических наук
Шукуров Рахим Рахманкулыевич

Оболенск 2021

Работа выполнена в Отделе медицинской биотехнологии Федерального бюджетного учреждения Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» г. Москва

Научный руководитель:

Шукуров Рахим Рахманкулович, кандидат биологических наук (03.01.03 – молекулярная биология), Общество с Ограниченной Ответственностью «Международный биотехнологический центр «Генериум», Владимирская область, управление фармацевтического анализа, начальник управления.

Официальные оппоненты:

Косовский Глеб Юрьевич доктор биологических наук (03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)), профессор РАН, директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства им. Афанасьева» Минобрнауки, Московская область.

Генералов Сергей Вячеславович кандидат биологических наук (03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)) ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Роспотребнадзора, г. Саратов, лаборатория профилактических иммуноглобулинов, ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «МИРЭА - Российский технологический университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Москва.

Защита диссертации состоится «11» июня 2021 г. в 13-00 ч на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, территория «Квартал А», дом 24, ФБУН ГНЦ ПМБ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ.

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.
Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Современное производство лекарственных средств (ЛС) на основе рекомбинантных белков включает дорогостоящие наукоемкие технологии, применение которых отражается на стоимости жизненно-важных лекарств. Снижение расходов на разработку способно сделать более доступным воспроизведение и разработку новых терапевтических белков. Для производства полноразмерных гликозилированных рекомбинантных белков чаще всего используют клеточные линии высших эукариот. Иммутизированные клетки яичников китайского хомячка (СНО), как производственная линия имеет ряд преимуществ. К ним относятся: качество производимого белка (корректный фолдинг и гликозилирование), высокая продуктивность среди клеточных линий млекопитающих, возможность производства белков любого размера, эти клетки не передают вирусов размножающихся только в клетках человека. Линия хорошо изучена и имеет широкие возможности для увеличения производительности благодаря оптимизации культивирования и высокой плотности биомассы благодаря суспензионный росту. Некоторые сублинии (-dhfr, -gs) способны легко амплифицировать экспрессионные кассеты, что также увеличивает производительность рекомбинантных линий (Noh S. M., et al., 2013). Для сокращения длительности и снижения затрат на разработку продуцирующей линии ведется поиск эффективных и простых способов отбора высоко производительных клеток из пула генетически измененных, несущих целевой трансген.

Степень разработанности темы исследования. Высокопродуктивные клетки в гетерогенных популяциях после трансфекции и амплификации генов встречаются редко, зачастую обладают низкой жизнеспособностью и скоростью роста из-за дополнительной метаболической нагрузки из-за чего их сложно выделить из популяции. Для упрощения биохимического скрининга в экспрессионный вектор вводят элементы S\MAR или UCOE, которые влияют на хроматин в том месте, где внедрился трансген усиливают его считывание и, следовательно, увеличивают долю высокопроизводительных клонов в выборке, а также маркеры дифференцированной селекции позволяющие выживать только самым производительным линиям (Kim, J.Y., et al., 2012). Высокопродуктивные трансфектанты отбирают применяя маркеры селекции и сортинга, которые обеспечивают повышенную жизнеспособность и скорость роста наиболее продуктивных клеток в селективной среде к ним относят гены DHFR или GS. К недостаткам использования этих генов как маркеров относят ограниченный круг доступных для манипуляций клеточных линий и снижение стабильности и производительности штамма в ряду поколений, пропорциональное раунду амплификации и концентрации селективного маркера (Browne S.M., et al., 2007). Удобным маркером сортинга является ген GFP, использование которого в сочетании с технологией FACS позволяет осуществлять отбор высокопродуктивных линий по интенсивности их флюоресценции (Islam M.Z., et al., 2012). Достоинством технологии является возможность ее применения для

любых клеточных линий. Однако ген GFP невозможно использовать в качестве полноценного МСС: возникает необходимость применения дорогостоящего оборудования обеспечивающего сортинг (Coquery C.M., et al., 2012). К МСС второго типа следует отнести экспонируемые на поверхности клеток белковые домены, полученные с помощью технологии клеточного дисплея и наделяющие трансфицированные клетки способностью к адгезии на каком-либо носителе (Cheng T.L., et al., 2007). Не вмешиваясь в клеточный метаболизм, данная технология может отбирать линии имеющих самый высокий уровень экспрессии интересующих рекомбинантных генов (Gotoh H., et al., 2007). Одна из первых технологий применения МСС данного типа включала метод p-hook – технику селекции, основанную на усиленной адгезии трансфецированных клеток, при которой экспонированные на мембране белки связываются с поверхностью сорбента (Chesnut J.D., et al., 2012). Однако, основным недостатком данной технологии для отбора чистой линии, является низкий уровень дифференцированности высоко- и низкопродуктивных клонов. Для эффективного избавления от фона возникает необходимость многократного повторения раундов селекции. По этим причинам дизайн экспрессионной конструкции с элементами упрощающими скрининг, разработка новых маркеров дифференцированной селекции способно существенно сократить расходы на получение стабильных и производительных клеточных линий, приводит к снижению себестоимости разработки производства лекарств, что является актуальной задачей.

Цель работы: создание нового маркера селекции и сортирования для клеток высших эукариот и оценка возможности быстрого и эффективного отбора клональных клеточных линий с повышенной производительностью рекомбинантного белка. Для этого были поставлены и решены следующие задачи:

1. Разработка и изготовление конструкций, содержащих варианты селективных маркеров, обеспечивающих адгезию с помощью химерных генов.
2. Оценка возможности дифференцированной селекции на разных вариантах носителя
3. Отбор высокопродуктивных клонов-трансформантов CHO-S на носителе.
4. Характеристика полученных линий по экспрессии гена-маркера
5. Сравнение нового способа отбора с традиционно применяемыми, при создании клеточных линий.

Научная новизна. Созданы генетические конструкции, усиливающие адгезию клеток-реципиентов на носителях, содержащих целлюлозу, что может применяться при культивировании на носителе. Создан новый маркер селекции и сортирования для интегрированных в геном конструкций. Модифицирована, и испытана система дифференцированной селекции на основе технологии «p-hook». Проведено сравнение скорости отбора производительной линии при вариантах селективного маркера. Клетка с эффективной экспрессией трансгенной кассеты может образовывать колонии и отбираться без

контаминации клетками исходного штамма или непроизводительными линиями.

Научно-практическая значимость исследования. В ходе работы были получены серии производительных клонов-продуцентов дарбэпоэтина альфа и полноразмерного моноклонального антитела инфликсимаба. Разработан новый протокол простой, эффективной селекции высокопроизводительной клеточной линии. Получена коллекция стабильных клеточных линий с высоким уровнем экспрессии модельного белка, для использования как основы для целевой интеграции при контролируемой вставке трансгена. Проведено сравнение скорости отбора клеточных линий с 2 разными селективными маркерами, которое показало сокращение временных затрат и расходных материалов в два и более раз.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Созданы химерные гены TiBP-PDGFR и CBD-PDGFR, белковые продукты которых сообщают способность продуцирующим их клеткам связываться с носителями – титаном и целлюлозной подложкой
2. Показана возможность дифференцированной селекции на целлюлозной подложке маркером CBD-PDGFR
3. Получена серия стабильных клональных линий при помощи химерного белка CBD-PDGFR с продуктивностью до 76 пг/клетку/день
4. Серия клональных линий охарактеризована по продуктивности гена-маркера, стабильности и скорости роста биохимическими методами и методами культивирования.
5. Проведено сравнение нового способа отбора с традиционно используемыми, при создании клеточных линий. Показано, что применение созданного химерного CBD-PDGFR-маркера в 2 раза сокращает время селекции высокопродуктивных стабильных клональных линий, и более чем в 2 раза сокращает затраты на расходные материалы.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение генетической конструкции, содержащей гены легкой и тяжелой цепей инфликсимаб под контролем разных гибридных промоторов. Гены, кодирующие легкую и тяжелую цепи МАТ инфликсимаб, были клонированы в экспрессионный вектор pVito-neo [InvivoGen, США] для получения экспрессионного вектора pVitroneo-Infliximab-LC-HC. При этом ген тяжелой цепи был соединен через IRES-элемент с геном, кодирующим маркер устойчивости к антибиотик G418. Таким образом, эти два гена транскрибировались в одну мРНК, с которой транслировались два белка, благодаря чему достигался более жесткий контроль экспрессии тяжелой цепи. Ген тяжелой цепи находился под контролем промотора CMVenh/rEF1, ген легкой цепи – под контролем промотора SV40/mEF1.

Элюция фрагментов из агарозного геля. DNA – фрагменты имеющие необходимую, относительно контроля ДНК-маркер O'GeneRuler 100-10,000 bp

(Fermentas, SM1173), длину вырезали из геля, переносили в предварительно взвешенные 1,5 мл пробирки и, повторно взвешивали для вычисления объема элюируемого фрагмента (плотность геля принимали равной единице). Добавляли 3 объема буфера QG. Инкубировали 10 минут при 50⁰C (для лучшей очистки можно 2-3 раза интенсивно перемешивать в течение инкубации.) Добавляли 1V изопропанола, смешивали и переносили на колонки, центрифугировали 1 минуту. Пробирку для слива очищали, затем колонку промывали еще раз 500 мкл буфера QG. Пробирку для слива очищали, затем в колонку добавляли 750 мкл буфера PE, для лучшего выхода инкубировали пробирку на столе 2-5 минут. Центрифугировали 1 минуту на максимальных оборотах 13000 rpm. Колонки переносили в чистые микроцентрифужные пробирки и добавляли 30 мкл буфера для элюции. Инкубировали 2 минуты на столе и центрифугировали 1 минуту на максимальных оборотах (13000 rpm). Очищенную днк отправляли на секвенирование.

Конструирование гена EYFP-IRES-iggHATiBP-mucPDGFR. Указанный ген конструировали в векторе pUC57 на основе вектора pCI-neo [Promega, США]. На первом этапе была синтезирована «Синтол», Россия] конструкция iggTiBP+mucPDGFR во временном транспортном векторе pUC57. Векторы pUC57-iggHA+mucPDGFR [реципиент] и pEYFP [Clontech, США] [донор] обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BglIII/BsrGI [использовали эндонуклеазы и ферменты нуклеинового обмена производства Fermentas [Литва]]. После выделения продуктов рестрикции в 1%-ном агарозном геле [камера для горизонтального электрофореза SE-2, Helicon, Россия] участок размером 800 п.н., содержащий ген EYFP, лигировали с соответствующими компонентами для получения конструкции pUC57-EYFP-iggHA+mucPDGFR. Из этой конструкции по сайтам для Xba/Not вырезали фрагмент EYFP-iggHATiBP-mucPDGFR и переносили его в вектор pCI-neo. ПЦР-продукт гена IRES [IRES FMDV из вектора pVITROneo [InvivoGen, США]] вырезали по сайтам Nhe/EcoRV и получали путем лигирования готовую конструкцию гена EYFP-IRES-iggHATiBP-mucPDGFR.

Конструирование гена EYFP-IRES-iggHATiBP-CBD-mucPDGFR. Ген EYFP-IRES-iggHATiBP-CBD-mucPDGFR получали на основе ранее созданного вектора pCI EYFP-IRES-iggHATiBP-mucPDGFR. ПЦР-продукт гена CBD [ген синтезирован в фирме «Синтол», Россия] в векторе pUC57 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции SacII и XhoI, разделяли продукты рестрикции в агарозном геле, вырезали участок размером 460 п.н., содержащий ген CBD и лигировали его с целью получения готовой конструкции, гена EYFP-IRES-iggHATiBP-CBDmucPDGFR. Правильность сборки экспрессионного вектора проверяли с помощью расширенного рестрикционного анализа. Нуклеотидные последовательности обоих генов и прилежащих к ним участков были подтверждены секвенированием [Evrogen, Россия].

Выделение m-RNA Micro-FastTrack 2 mRNA Isolation Kit (Thermo Scientific, USA). Для выделения матричной РНК из клеток млекопитающих отобраны клетки по 2×10^6 на пробу. Клетки осаждали центрифугированием, отмыли PBS буфером. Лизирующий буфер готовили, добавляя 20 микролитров. рибонуклеазы добавляли к 1 мл лизирующего буфера. К отмытым клеткам

добавляли 1 мл лизирующего буфера и инкубировали 20 мин. при $t=450^{\circ}\text{C}$. Центрифугировали 4000g 5 минут. Переносили супернатант в новые пробирки. Добавляли 63 микролитров 5М раствора NaCl, и перемешивали. Для удаления ДНК раствор 4-6 раз пропускали через шприц с иглой №21. Перенесли супернатант в пробирку с Oligo(dT) cellulose power. Инкубировали при комнатной температуре 2 мин. Затем 20 минут инкубировали при бережном покачивании. Центрифугировали 4000g 5 минут. Бережно отбирали и удаляли супернатант. К осадку добавляли 1,3 мл связывающего буфера (Binding Buffer) Центрифугировали 4000g 5 минут. Убирали супернатант, повторяли процедуру 2 раза. Промывали осадок (Oligo(dT)) 500 микролитров связывающего буфера. Центрифугировали 4000 g 10 секунд. Промывали (Oligo(dT)) 200 микролитров низкосолевым промывочным буфером, центрифугировали 4000 g 10 секунд. Переносили колонки в новые микроцентрифужные пробирки 1,5 мл. Ресуспензировали в 100 микролитров буфера для элюции. Центрифугировали 4000 g 10 секунд. Повторили процедуру 2 раза. К 200 микролитров элюата добавляли 10 микролитров гликогена, 30 микролитров 2М ацетата натрия, +600 микролитров этанола и смешивали. Замораживали в сухом льду и далее в морозильнике -70°C . Размораживали центрифугированием при 16000g 15 мин $+40^{\circ}\text{C}$, удаляли весь этанол. Ресуспензировали матричную РНК в 10 микролитрах буфера для элюции (Elution Buffer). Хранили при -70°C .

Выделение хромосомной DNA набором GeneJET™ Genomic Purification Kit. Для выделения хромосомной ДНК из суспензионных клеток млекопитающих собирали количество клеток не менее 5×10^6 на пробу. Клетки осаждали центрифугированием 250g 5 минут, отмывали PBS буфером. К отмытым клеткам добавляли 200 микролитров PBS буфера и ресуспензировали. Добавляли 200 микролитров лизирующего раствора, с протеинкиназой А. Тщательно смешивали до получения однородной суспензии. Инкубировали образец при 56°C , периодически перемешивая до полного лизиса (около 10 минут). Добавляли 20 микролитров раствора рибонуклеазы А смешали, инкубировали при комнатной температуре 10 минут. Добавляли 400 мл 50% этанола и перемешивали. Переносили лизат на колонки, центрифугировали при 6000g 1 минуту. Переносили колонки в новые пробирки или очистили пробирки от жидкости. Добавили 500 микролитров промывочного буфера (Wash Buffer) центрифугировали при 8000g 1 минуту. Удаляли промывочную жидкость из пробирок. Добавляли 500 микролитров промывочного буфера (Wash Buffer) центрифугировали при 12000g 3 минуты. Переносили колонки в новые 1,5 мл пробирки. Добавили 200 микролитров буфера для элюции (Elution Buffer), инкубировали 2 мин. при комнатной температуре. И центрифугировали 1 минуту при 8000g. Определяли концентрацию ДНК. (Хранили при -70°C).

Культивирование клеточной линии CHO-S. Культивирование клеточной линии CHO-S [Invitrogen, США] осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 125 и 250 мл на шейкере- CO_2 -инкубаторе Multitron Cell [Infors HT, Швейцария]. Частота вращения 125 об/мин в атмосфере 5% углекислого газа при температуре 37° и влажности 95%. Пересев осуществляли каждые 2-3 дня до плотности $0,3 \times 10^6$ клеток/мл. Использовали бессывороточную питательную среду SFM (Lonza, Швейцария)

Анализ инфицирования клеточных линий микроорганизмами рода *Mycoplasma* Отобирали по 100 мкл культуральной жидкостью в 1,5 ml. Пробирки с КЖ инкубировали при 95°C в течение 5мин. Готовили смесь для ПЦР - необходимое количество регидрирующего буфера из набора Sigma (cat. № M4695) из расчета 23 мкл на одну пробу. К регидрирующему буферу добавили Taq-полимеразу (5 у/мкл (Fermentas, EPO282) из расчета 0.5 мкл Taq-полимеразы на одну реакцию. Пробирки центрифугировали при 8000g 1 минуту. Отобирали по 2 мкл супернатанта и помещали в пронумерованные стрипы набора Sigma. К стрипам с образцами добавляли по 23 мкл приготовленного раствора. В 3 стрипа добавляли по 2 мкл mQ-воды (отрицательный контроль). К стрипам, содержащим положительный контроль (cat. P9123), добавляли по 25 мкл раствора № 1. Инкубировали все стрипы в течение 5 мин при комнатной температуре. Использовали амплификатор (Bio-Rad, #PTC-0220G);

Программа:

1 цикл 94° С 2 мин

40 циклов 94° С 30 сек

55° С 30 сек

72° С 40 сек

Охладить до 4-8°C

Готовили 1.2% агарозный гель:

0.6г агарозы (Helicon, LE-2);

50 мл 1X TAE-буфера;

Добавляли 10 мкл бромида этидия. Залили раствор в камеру для горизонтального электрофореза с 2мя гребенками (Helicon, SE-2). Образцы из амплификатора вносили по 8 мкл в гель. Гель анализировали в трансиллюминаторе (Vilber-Lourmat, TCP-20.LM).

Трансфекция клеточной линии CHO-S. Процедуру проводили, используя липофильный агент FreeStyle MAX [Invitrogen] согласно инструкции производителя. Культуру клеток CHO-S за сутки до трансфекции выращивали до плотности $0,5 \cdot 10^6$ кл/мл. В день трансфекции определяли оптическую плотность культуры, клетки осаждали центрифугированием при 200 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Супернатант удаляли декантацией, клетки ресуспендировали в среде FreeStyle™ CHO Expression Medium [Invitrogen], содержащей 8 mM аланил-глутамин [Invitrogen] до конечной плотности $1,0 \cdot 10^6$ кл/мл. Суспензию клеток в равных долях помещали в центрифужные пробирки с коническим дном. Центрифугировали 3 минуты при 200g и $t = 24^0$ С. За 24 часа до трансфекции пассировали клетки CHO-S в новую культуральную среду до плотности 5×10^5 клеток/мл и выращивали при 120-130 rpm, 37°C, 8% CO₂. Все используемые питательные среды перед применением прогревали в термостате до 37±20С. В среду для культивирования FreeStyle™ CHO Expression Medium вносили добавки: GlutaMAX (Invitrogen) и HT (Invitrogen) до концентрации 4 mM и 1%, соответственно. Перед проведением трансфекции производили подсчет клеток в камере Горяева. Аккуратно переперемешивали пробирку с FreeStyle™ MAX Reagent 4 раза. В лунке 96-и луночного планшета смешивали 10 мкл FreeStyle™ MAX Reagent и 150 мкл среды DMEM/F-12. Перемешивали

плавным пипетированием и оставляли на 3 минуты. [FreeStyle CHO-S Cells, Invitrogen, Cat. # R800-07].

Проверка моноклональности методом предельных разведений. Проверку моноклональности стабильных клонов - проводили методом предельных разведений. Для этого суспензию клеток в логарифмической фазе роста разводили средой SFM [Lonza, Швейцария] до плотности 2,5 клеток/мл и добавляли к каждому разведению кондиционированную среду до конечной концентрации 20% v/v. Суспензию разливали по 0,1 мл в лунки 96-луночных планшетов, используя по 10 планшетов на каждую суспензию. Планшеты помещали в CO₂-инкубатор для культивирования в атмосфере 5%-ного углекислого газа при температуре 37° и влажности 95% в течение 10- суток. После 10 суток, отбирали клеточную суспензию и ростовую среду в лунках в которых наблюдался рост. Поскольку число клеток, попавших в лунку, подчиняется распределению Пуассона, то вероятность отсутствия клональности. Рассчитывали количество клеток для разведения так, чтобы в 100 микролитрах культуральной жидкости находилось по 300 клеток. Разведенная до необходимой плотности клеточная суспензия по 100 микролитров переносилась в 96-ти луночные планшеты. Время роста – 2 недели.

Иммуноферментный анализ Анализ продуктивности клонов IgG инфликсимаб проводился с использованием ИФА-набора Serazym IgG ELISA kit (Seramun, Германия). Для проведения ИФА анализа дарбэпоэтина использовали набор «Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ» («Вектор-БЕСТ», Россия) с калибровкой по препарату Аранесп (Amgen, США). Разведение для ИФА анализа бралось 50 000 раз. Анализ проводился в соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору реагентов «Вектор БЭСТ». Набор реагентов, включая планшет, прогревали до комнатной температуры в течение 30 мин. В лунки стрипов вносили по 100 мкл раствора для разведения. Готовили фосфатно-солевой буфер (ФСБ-Т) разведением 40 мл концентрата в 960 мл воды очищенной. Закрывали поверхность планшета липкой пленкой, входящей в состав набора, и инкубировали в течение 45 мин в термостатируемом шейкере с частотой 700 об/мин при 37 °С. По окончании инкубации снимали пленку, удаляли содержимое лунок. В каждую лунку вносили по 350 мкл ФСБ-Т, инкубировали 1 мин, удаляли содержимое. Повторили процедуру промывки 5 раз. По окончании промывки удалили остатки влаги из лунок планшета, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге. В каждую лунку внесли по 100 мкл раствора конъюгата. Закрывали поверхность планшета липкой пленкой, входящей в состав набора, и инкубировали в течение 30 мин в термостатируемом шейкере с частотой 600-800 об/мин при 37 °С. По окончании инкубации проводили промывку лунок планшета. В каждую лунку планшета вносили по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидаина. Помещали планшет со стрипами в защищенное от света место, инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Во все лунки планшета вносили по 100 мкл стоп-реагента. Измеряли оптическую плотность в лунках планшета на анализаторе при длине волны 450 нм, референсная длина волны 650 нм. Измерение проводили в течение 10 минут после внесения стоп-реагента. Концентрацию EYFP определяли Anti-GFP antibody Cat.# AB011(Евроген, Россия) согласно инструкциям

производителя.

Проточная цитометрия Интенсивность флуоресценции оценивали на проточном цитометре Beckman Coulter Navios [Германия]. Параметры измерения были следующие: длина волны 488 нм, эмиссия 500 нм, количество событий 10 000. Результаты рассчитывали с помощью программы FlowJo 10.0.Br1. Автофлуоресценцию измеряли у исходной нетрансфицированной культуры, находящейся на той же стадии роста. Полученные значения вычитали как фоновые из флуоресценции EYFP-положительных пулов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Создание химерных конструкций экспонирующих домены связывающие клетки с носителем на мембране

Чтобы экспонировать на поверхности клеточной мембраны участки белков, которые могут связываться с носителем – целлюлозой или металлом – были сконструированы химерные гены. Они состояли из последовательности, кодирующей целлюлозосвязывающий и/или металл-связывающий домен, слитый с последовательностью трансмембранного фрагмента белка PDGFR и тег-последовательностью Мус. Целевая структура гена EYFP была соединена через IRES-элемент с синтетическим геном и служила маркером коэкспрессии целевого и маркерного белка. В таблице 1 приведены данные о механизме адсорбции клеток на носителях с помощью указанных химерных белков.

Таблица - 1 Схема действия химерных белков закрепленных на мембране PDGFR доменом и связывающихся с разными типами носителя

Название конструкции	Химерная конструкция	Схема действия	Адгезия на носителе
CBD-EYFP+	CMVpr EYFP polyA EF1a pr CBD PDGFR polyA		Целлюлоза
TiBP-EYFP+	CMVpr EYFP IRES igg TiBP PDGFR polyA		Металлы, TiO ₂ , Si

Часть Мус-тега между трансмембранным доменом и участком связывания с носителем была добавлена в последовательность CBD-PDGFR векторной конструкции для повышения контрастности системы отбора. Клетки с более активной экспрессией данной конструкции получали дополнительное преимущество при сорбции из-за того, что в этом случае с сорбентом взаимодействовал более длинный химерный белок, экспонированный на тех частях мембраны, которые не касаются непосредственно носителя. Исследовали адгезию на металлической поверхности пула клеток, экспрессирующих конструкцию (TiBP-EYFP+) – (металл-связывающая последовательность), и использующих ее в качестве связывающего домена. Для проверки возможности применения изготовленных векторов к созданию производительных клональных линий, мы изучили особенности трансфекции ими клеток CHO. Серии экспериментов показали, что трансфецируемость векторов не значительно отличается от коммерческого pEYFP+ и, этот параметр не является препятствием для их применения. Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Характеристика клеток при трансфекции созданных векторов

Вектор	pEYFP+ n=20	pDEPO n=5	pINFLEX n=5	pCBD- EYFP+ n=20	pTiBP- EYFP+ n=10
Транзиентно трансфицированные клетки, %	30÷15	21÷11	8÷6	12÷8	12÷ 8
Жизнеспособные клетки, %	95÷2	95÷2	79÷2	94÷2	94÷2

Сорбция клеток на титановых кольцах

Из использованных в данной работе конструкций металлсвязывающая последовательность [TiBP-EYFP+] обуславливала адгезию клеток на металле. (Таблица 3) Обеднение исходного трансфицированного пула при переносе сорбента со связанными клетками в свежую среду (рисунок 1). Такое различие наблюдали при использовании только тех конструкций химерного белка, в которых металлсвязывающий элемент располагается в непосредственной близости к анкеру PDGFR (Таблица 3).

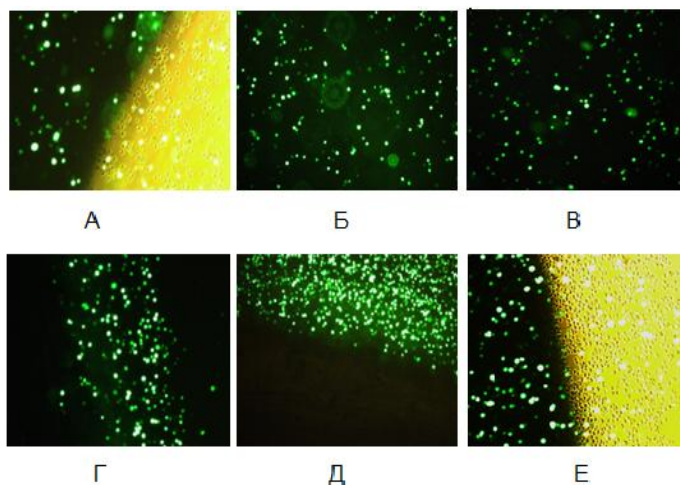


Рисунок 1- Сорбция клеток на титановых кольцах. А, Б - пул клеток трансфицированный контрольной EYFP+ конструкцией в первый день, после трансфекции, В - пул трансфицированный контрольной конструкцией во второй день, после трансфекции. Г, Д - пул клеток трансфицированный целевой EYFP-TiBr конструкцией в первый день, после трансфекции, Е - пул трансфицированный EYFP-TiBr конструкцией во второй день, после трансфекции.

Таблица 3 - Обоedнение исходного трансфицированного пула при переносе сорбента со связанными клетками в свежую среду

Конструкция	Процент светящихся клеток относительно жизнеспособных		Процент светящихся клеток после переноса	
	Клеточная плотность $\times 10^6$	% светящихся клеток	Клеточная плотность $\times 10^6$	% светящихся клеток
CBD-PDGFR	1,98	9,5%	2,31	4,3%
Контроль	2,2	12,2%	2,2	14,3%

Ни перенос титановых колец с сорбированными клетками в свежую среду, ни декантирование несвязанной клеточной суспензии, не позволили обогатить пул трансфектантами. Заметных и воспроизводимых изменений количества трансфицированных вектором TiBP-EYFP+ клеток с высокой, по сравнению с исходным пулом, экспрессией не наблюдали. Результат сохранялся при нескольких последующих повторах процедуры декантации несвязанной клеточной суспензии. На 2-е сутки инкубации разница в связывании клеток с высокой экспрессией трансгена и нетрансфицированных клеток уже визуально не регистрировалась. Это может быть связано с активной экспрессией кадгеринов при высоком клеточном титре на бессывороточной среде, следовательно, с усилением фоновой неспецифической сорбции. Адгезию могли также нивелировать глобулярные белки, высвобождаемые пулом в среду.

Сорбция клеток на целлюлозной подложке

Полученные данные предварительно указывали на возможность проводить селекцию при помощи маркера, содержащего CBD-домен. Сильное устойчивое связывание трансфицированных клеток с волокнами целлюлозы обнаруживалось в случае, если целевая конструкция содержала CBD [Рисунок 2]. После переноса носителя с адсорбированными клетками в свежую среду большая часть связанных клеток, или 15–30% от общего количества клеток, использованных для трансфекции, оставалась на носителе. Этот показатель был сравним с показателем эффективности трансфекции, который составлял обычно 10–40%. Разница в количестве трансфицированных клеток между исходным пулом и пулом клеток, связанных с подложкой, сохранялась даже после того, как трансфицированные клетки элиминировали трансгенный вектор, и переставали продуцировать флуоресцентный белок, что также можно было наблюдать при микроскопировании (Рисунок 2)..

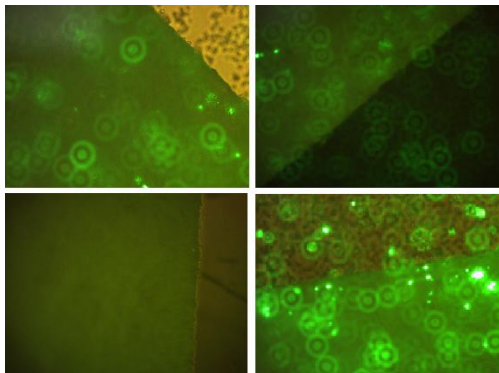


Рисунок 2 - Целлюлозная подложка в пуле клеток трансфицированных контрольной конструкцией EYFP+

Сложность в изучении селекции с использованием волокон целлюлозы обнаруживалась при переносе носителя с клетками на свежую среду, поскольку на носителе осаждались не только клетки EYFP+, но также и некоторая часть нетрансформированных клеток, обладавших, по-видимому, повышенной способностью к адгезии (Рисунок 3).

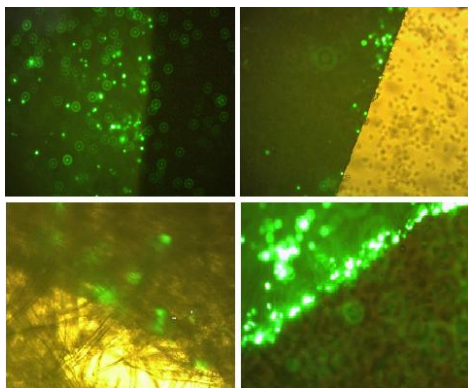


Рисунок 3 - Фотографии подложки в пуле клеток трансфицированных целевой конструкцией [CBD-EYFP+]

Пул клеток, адсорбированных на носителе, при культивировании в течение двух недель обогащался стабильными трансфектантами, однако соотношение клеток дикого типа и модифицированных было ниже, чем в исходном транзитном пуле. Специфичность отбора удалось кардинально улучшить в результате увеличения концентрации генетицина в среде до 600 мкг/мл и за счет более жесткого 3-кратного промывания носителя перед переносом на свежую ростовую среду один раз в 2–3 дня. Предварительные опыты с клетками, содержащими конструкцию с CBD-доменом, слитым с PDGFR геном, показал сильное связывание с волокнами целлюлозы. Достаточное количество ярко светящихся трансфектантов на носителе оставалось при эффективности трансфекции не ниже 10-12%. Один или два носителя размером 2x5мм инкубировали 2 часа в 2 мл трансфицированного пула на второй день после обработки. Тщательно отмывали носитель от несвязанных клеток, переносили в новую среду и фиксировали рост колоний на 8-й, 10-й и 14-й день после трансфекции (Рисунок 4).

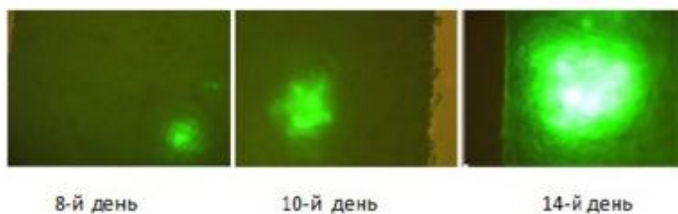


Рисунок 4 - Колонии, выросшие на целлюлозной подложке в трансфицированном пуле pCBD-EYFP+ в присутствии антибиотика.

Колонии, отобранные на носителе в присутствии повышенного содержания генетицина, продолжали рост и демонстрировали стабильную, высокую экспрессию EYFP белка. Выросшие клоны не расщеплялись по косвенному для адгезии признаку – экспрессии белка EYFP. Было проведено шесть серий трансфекций с количеством трансфицированных клеток не менее 500×10^3 клеток на точку. В каждом случае на целлюлозной подложке отбиралось от одной до пяти светящихся колоний. Селекция с антибиотиком G418 в течение 2 недель позволила эффективно выделить и наработать биомассу позитивных клонов. Отбирали пробы и анализировали по продуктивности с помощью ИФА анализа. Для выравнивания клеток по скорости роста в планшетах рассчитывалась клеточная плотность и жизнеспособность. Сорбцию трансфектантов, содержащих целевые конструкции CBD-EYFP+, но не контрольных EYFP+ [светящиеся клетки на фрагменте носителя отсутствовали]. Колонии, отобранные на носителе в присутствии повышенного содержания генетицина, продолжали рост и демонстрировали стабильную, высокую экспрессию EYFP белка.

Оценка экспрессии целевой конструкции и гомогенности отобранных клональных линий

Для того, чтобы проанализировать клоны по производительности модельного белка, они были изолированы и проведены измерения интенсивности флуоресценции клеточных суспензий с помощью проточной цитометрии (Рисунок 5). Для характеристики уровня экспрессии в отобранных клонах, а также структуру популяций [гетерогенность и стабильность отобранных линий], клоны были сняты с подложки и культивировались, как клеточные суспензии. Флуоресценцию измеряли на 20 и 35 пассаже после изоляции клеточных линий. В качестве контроля и для нормирования экспрессии *EGFP* белка был взят пул клеток на четвертый день после трансфекции. Некоторые клоны показывали существенную гетерогенность, что хорошо иллюстрируется изображениями, полученными во время анализа.

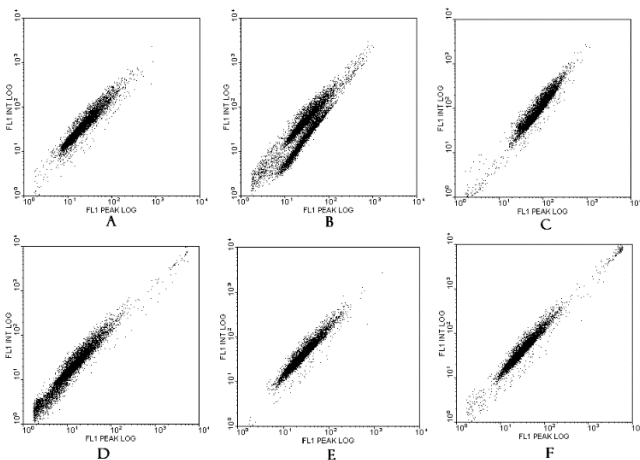


Рисунок 5 - Измерение флуоресценции клеточных суспензий с помощью проточной цитометрии. D – интенсивность флуоресценции у исходного трансфицированного пула; C – у клона с наибольшей интенсивностью флуоресценции; A, B, E, F – клеточные суспензии со средней интенсивностью свечения, соответственно.

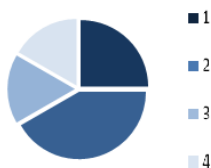


Рисунок 6 - Распределение количества клонов по продуктивности в трансфицированном пуле конструкцией, отобранной химерным сортином. 1-сверхпродуктивные клоны [$>100\text{мг/л}$], 2- продуктивные клоны [$>30, <100\text{мг/л}$], 3-низкопродуктивные клоны [$<30\text{мг/л}$], 4- «молчащие» клоны.

В то же время, анализ флуоресценции отобранных культур показал, что это стабильные трансфектанты, т.е. клоны не расщеплялись по косвенному для адгезии признаку – экспрессии белка EYFP. Соотношение проанализированных клонов для поиска одного производительного составило 2\3. Химерный сортинг был произведен за 2 недели. Селекция не потребовала

второго раунда. Доля сверхпродуктивных клонов составляла четверть стабильных линий, собранных для анализа. Продуктивности клонов, отобранных химерным сортином (Рисунок 7).

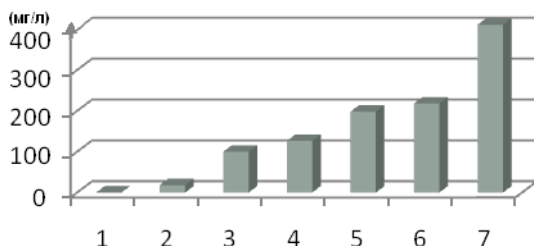


Рисунок 7 - Продуктивность лучших клонов после сортирования. 3-7 номера клонов, 100-400 мг/л количество белка - репортера EYFP в культуральной жидкости на 5 день культивирования измеренное методом ИФА.

Сравнение схемы скрининга при использовании химерного сортирования с традиционными

Сравнив коллекции клонов после скрининга, в каждом случае мы получали представительную выборку клонов для последующего отбора и анализа по корректности гликозилирования, фолдинга и секреции. Сравнив коллекции клонов после скрининга, в каждом случае мы получали представительную выборку клонов для последующего отбора и анализа по корректности гликозилирования, фолдинга и секреции. Отличие в продуктивности моноклональных линий от исходного пула в сорок и более раз мы получили при использовании S/MAR элемента или использования созданного маркера сортирования (Таблица 4). Стабильность клеточных линий усиливается за счет селекции в популяции генетически стабильных трансфектантов и самоуничтожения колоний, расщепляющихся при нестабильной экспрессии. Этап биохимической оценки полученной выборки клонов показал высокую продуктивность линий, полученных данным образом.

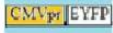
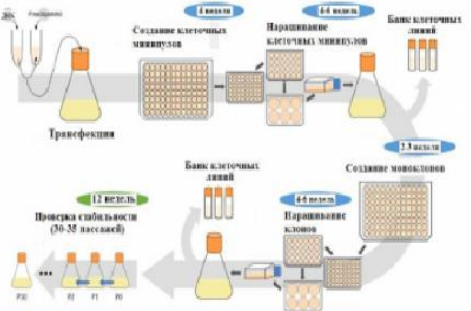
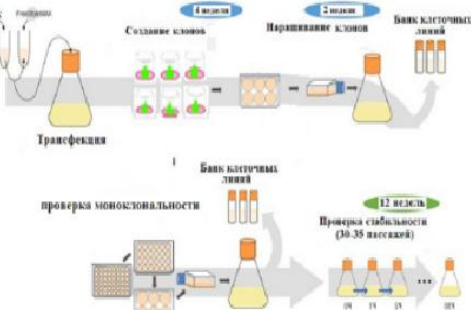
Таблица 4 - Определение продуктивности у трех лучших клонов отобранными разными системами скрининга

Метод	№ клона	Концентрация целевого белка мг/л ($\bar{x} \pm \sigma$)	Число живых клеток, $\times 10^6$ клеток/мл ($\bar{x} \pm \sigma$)	Время удвоения, ч ($\bar{x} \pm \sigma$)	Удельная продуктивность, пг/клетку/день ($\bar{x} \pm \sigma$)
Метод предельных разведений + S/MAR	13	44,9 $\pm$ 2,5	9,3 $\pm$ 0,3	17,3 $\pm$ 1,1	13,8 $\pm$ 0,35
	17	48,2 $\pm$ 3,1	7,9 $\pm$ 0,5	18,1 $\pm$ 1,2	14,2 $\pm$ 0,24
	28	101,7 $\pm$ 9,4	13,6 $\pm$ 0,7	15,8 $\pm$ 1,4	21,4 $\pm$ 0,10
Химерный сортинг	10	72,7 $\pm$ 3,2	7,2 $\pm$ 0,3	19,7 $\pm$ 1,1	19,4 $\pm$ 0,44
	11	83,5 $\pm$ 12,1	5,4 $\pm$ 0,6	22,1 $\pm$ 1,4	24,2 $\pm$ 0,80
	12	380,4 $\pm$ 14,5	5,6 $\pm$ 0,5	22,2 $\pm$ 1,2	76,1 $\pm$ 0,66
Метод предельных разведений	15	54,4 $\pm$ 4,4	5,0 $\pm$ 0,9	24,6 $\pm$ 1,6	8,4 $\pm$ 0,13
	9	18,8 $\pm$ 6,1	4,7 $\pm$ 0,4	34,2 $\pm$ 1,3	5,2 $\pm$ 0,65
	18	16,8 $\pm$ 9,2	3,6 $\pm$ 0,5	27,8 $\pm$ 1,3	4,9 $\pm$ 0,34

Затраты на поиск производительных клонов соотносятся с литературными данными для маркеров сортинга. Соотношение проанализированных клонов для поиска одного производительного составило 1\3. Отбор и биохимический анализ клональных линий выборки, полученных методом был произведен за 1,5 месяца. Применение созданного химерного CBD-PDGFR-маркера селекции и сортинга приводит к быстрому отбору высокопродуктивных стабильных трансфектантов, что снижает затраты на получение коллекции продуктивных клеточных линий. В результате, данная система представляет собой гибрид из селекции на носителе, дифференцированном отборе клеток с

помощью оценки инструментальными методами соэкспрессирующегося белка и методы отбора клонов (таблица 5).

Таблица 5 - Изменение в схеме скрининга при химерном сортинге

ВЕКТОР/ продукт	последовательность получения и валидации клеточных линий	
pEYFP+/ флуоресцентный белок  -G418- антибиотик		традиционная селекция
pINFLX/ инфлиksiмаб  -G418- антибиотик		
pDEPO/ дарбепоеитин  -G418- антибиотик		
CBD-EYFP+ /флуоресцентный  CBD впервые используется в качестве маркера		химерный сортинг

Отбор клеточных линий из растущих на целлюлозной подложке колоний при помощи созданного маркера селекции имеет преимущества в скорости – за счет возможности проверять моноклональность пула, полученного из одной колонии параллельно с другими методами оценки коллекции созданных клеточных линий. Затраты на поиск производительных клонов соотносятся с литературными данными для маркеров сортинга. Время селекции высокопродуктивных стабильных клональных линий сократилось более чем в 2 раза, затраты на расходные материалы сократились более чем в 4 раза (таблица 6).

Таблица 6 - Сравнение нового способа отбора с традиционно применяемыми по временным и материальным затратам

Целевой белок	Расходные материалы и реактивы	Скорость скрининга до получения моноклональных линий
pEYFP+/ флуоресцентный белок	320 96-луночных планшета	16 недель
-G418- антибиотик	4 24-луночных планшета,	
pINFLEX/ инфликсимаб	10 6-луночных планшетов	
-G418- антибиотик	15 ИФА наборов,	8 недель
pDEPO/ дарбэпозтин	10 литров бессывороточной среды	
pCBD-EYFP+ /флуоресцентный белок	10 6-луночных планшетов, 4 24-луночных планшета, 1 ИФА набор 1 литр бессывороточной среды	

Выводы:

1. Созданы химерные гены TiBP-PDGFR и CBD-PDGFR, белковые продукты которых сообщают способность продуцирующим их клеткам связываться с носителями – титаном и целлюлозной подложкой
2. Показана возможность дифференцированной селекции на целлюлозной подложке маркером CBD-PDGFR
3. Получена серия стабильных клональных линий при помощи химерного белка CBD-PDGFR с продуктивностью до 76 пг/клетку/день
4. Серия клональных линий охарактеризована по продуктивности гена-маркера, стабильности и скорости роста биохимическими методами и методами культивирования.
5. Проведено сравнение нового способа отбора с традиционно используемыми, при создании клеточных линий. Показано, что применение созданного химерного CBD-PDGFR-маркера в 2 раза сокращает время селекции высокопродуктивных стабильных клональных линий, и более чем в 2 раза сокращает затраты на расходные материалы.

Список публикаций автора в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Р.Р.Шукуров, Н.В. Лобанова, И.Н.Савинова, **И.Г.Воробьева**, А.А.Нурбаков, Л.В.Ермолина, Н.В.Орлова, А.Г.Мосина, Л.П.Антонова, Р.А.Хамитов, Ю.А.Серегин. Создание стабильной клеточной линии — продуцента рекомбинантного дарбэпоэтина-альфа на основе клеток CHO. **Биотехнология**. – 2013.- № 2, С. 46-543. РИНЦ ИФ= 0,595, WoS. Количество цитирований: 2

Версия статьи: R.R.Shukurov, N.V.Lobanova, I. N.Savinova, I. G.Vorobyova, A.A.Nurbakov, L.V. Ermolina, N.V.Orlova, A.G.Mosina, L.P.Antonova, R.A.Khamitov, and Yu.A.Seryogin “Design of a stable cell line producing recombinant darbepoetin alpha based on CHO cells”. «Прикладная биохимия и микробиология», 2014, Т. 50, № 9, С. 812-818 РИНЦ ИФ= 1.022. Количество цитирований: 2

2. **И.Г.Воробьева**, Р.Р.Шукуров, Ю.А.Серегин, Смирнова Е.А.Создание штамма-продуцента моноклонального антитела инфликсимаб на основе линии клеток CHO. **Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие**. 2013. Т. 8. № 4. С. 85-89. **ВАК (на момент опубликования)**

3. **И.Г. Воробьева**, Р.Р. Шукуров, Д.Г.Козлов, Т.Б.Корягина, Н.В.Антипова, В.Н.Степаненко. Модификация системы, основанной на применении маркеров селекции и сортинга, для отбора стабильных трансфектантов **Биотехнология**, 2018, Т. 34, № 2, С.9 – 17 РИНЦ ИФ= 0,595, **SCOPUS, WoS**

Версия статьи: Modification of a System Based on the Use of Selection and Sorting Markers for the Screening of Stable Transfectants. I.G. Vorobyova, R.R. Shukurov, N.V. Antipova, V.N. Stepanenko. «Прикладная биохимия и микробиология», 2018, Т. 54, № 9, 842-848 РИНЦ ИФ= 1.022 **SCOPUS, WoS**

4. Ельчанинов А.В., Макаров А.В., **Воробьева И.Г.**, Кананыхина Е.Ю., Лохонина А.В., Глинкина В.В., Большакова Г.Б., Гольдштейн Д.В., Фатхудинов Т. Регуляция пролиферации гепатоцитов после субтотальной резекции печени крыс. **Гены и Клетки**. 2018. Т. 13. № 4. С. 37-42. **SCOPUS**

5. **Воробьева И.Г.**, Карягина Т.Б. Проверка фенотипической стабильности генетически измененных клеток отобранных методом химерного сортинга. **Гены и Клетки**. 2019. Т. 14. № S1. С. 55. **SCOPUS**

В сборниках трудов конференций:

1. Shukurov R., Savinova I., Kazachenko K., Lobanova N., **Vorobyeva I.**, Seregin Y. Enhanced control of recombinant IgG expression in CHO cells by genetic construct with heavy chain and selection marker separated by IRES element. Abstracts of the Protein and Antibody Engineering Summit (**PEGS 2012**), Vienna, Austria, 6-8 November 2012, C- 24

2. Rahim Shukurov, Irina Savinova, **Iva Vorobyeva**, Yury Seregin. Medium optimization improves glycosylation profile of recombinant darbepoetin alfa in CHO cells. Abstracts of the Protein and Antibody Engineering Summit (**PEGS 2013**), Lisbon, Portugal, 4-8 November 2013, c- 159.

3. Enhanced control of recombinant IgG expression in CHO cells by genetic construct with heavy chain and selection marker separated by ires element. «БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ И МЕДИЦИНА» Москва, Март 19-22, 2013, с- 159.

4. Болотова А.А., **Воробьева И.Г.**, Павленко Д.М., Корягина Т.Б., Степаненко В.Н. Создание клеточной линии продуцента фолликулостимулирующего гормона человека при использовании технологии Crispr/Cas9. XXIX Зимняя молодежная научная школа «перспективные направления физикохимической биологии и биотехнологии» **Москва, 2017 г.**, 7-10 февраля, С - 113