

На правах рукописи

Тимонова Софья Сергеевна

**СОЗДАНИЕ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ
МОНОКЛОНАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ
АКТИВНЫЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ ЛИЗОСОМАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ
АРИЛСУЛЬФАТАЗУ В И ИДУРОНАТ-2-СУЛЬФАТАЗУ**

Специальность 1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Оболенск – 2022

Работа выполнена в Акционерном обществе «ГЕНЕРИУМ» в отделе клеточной биологии (ОКБ) департамента генно-инженерных биологических препаратов в 2016–2021 г.

Научный руководитель

Пискунов Александр Александрович, кандидат биологических наук, Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ», департамент генно-инженерных биологических препаратов, директор департамента.

Официальные оппоненты:

Игнатъев Георгий Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория молекулярной биотехнологии, старший научный сотрудник, г. Москва

Юрков Сергей Григорьевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, лаборатория «Лекарственные средства для животных», главный научный сотрудник, пос. Вольгинский, Владимирская обл.

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

Защита состоится «07» октября 2022 г. в «13» часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, 142279, 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 по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 64.1.002.01
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Мукополисахаридоз (МПС) – группа орфанных генетических заболеваний, вызванных отсутствием или неправильным функционированием лизосомальных ферментов, необходимых для расщепления гликозаминогликанов (мукополисахаридов) (Braunlin, E. A., et. all, 2011).

МПС II наследуется по X–сцепленному рецессивному типу. Вследствие мутации гена IDS происходит недостаточность лизосомального фермента идуронат-2-сульфатазы (I2S). Дисфункция данного фермента приводит к накоплению гликозамингликанов в тканях и органах. МПС II является наиболее распространённой формой (Verma, S., et. all, 2021).

МПС VI типа наследуется по аутосомно-рецессивному типу, и вызван нарушением функции фермента арилсульфатазы B (ASB). Дисфункция гена ARSB проявляется в накоплении преимущественно дерматансульфата в лизосомах, что постепенно приводит к задержке роста, выраженным скелетным деформациям, патологиям сердечно-сосудистой системы и т. п. (Ahmed, A, et. all, 2014).

Таблица 1 – Мукополисахаридоз II и VI типов. Данные 2021 года.

Тип	Название	Ген	Недостающий фермент	Больных в России	Затраты в год на больных в России, 2021 год, руб.
МПС II	Синдром Хантера	IDS	идуронат-2-сульфатаза	110	Препарат «Элапраза», 3,1 млрд рублей
МПС VI	Синдром Маротто–Лами	ARSB	арилсульфатаза B	56	Препарат «Наглазим», 1,2 млрд рублей

Стандартное лечение МПС VI типа, утверждённое Минздравом РФ, предусматривает использование ферментной заместительной терапии (ФЗТ) препаратом «Наглазим» (Naglazyme[®], BioMarin, США), а для МПС II типа – препаратом «Элапраза» (Elaprase[®], Shire, США), (табл. 1), (Brunelli, M. J., et. all, 2016; Alcalde-Martín, C., et. all, 2010).

Создание отечественных биофармацевтических препаратов является актуальной задачей для фарминдустрии в РФ. Разработка препаратов для ФЗТ МПС II и VI типов позволит:

- ✓ получить опыт в создании отечественных биофармацевтических препаратов;
- ✓ обеспечить пациентов высококачественным доступным препаратом;
- ✓ существенно снизить нагрузку на федеральный бюджет, который закупает импортные препараты «Наглазим» и «Элапраза» для больных МПС II, VI (табл. 1);
- ✓ получить высокотехнологичные отечественные биопрепараты ASB и I2S на основе клеточной линии млекопитающих СНО без использования белков животного происхождения.

Степень разработанности темы исследования. Создание биофармацевтических препаратов требует уникального дорогостоящего оборудования и нестандартных подходов в решении технологических задач. Получение клонов-продуцентов – один из ключевых моментов в разработке биопрепаратов. В данной диссертации отработаны следующие стадии в создании биопрепарата: создание генно-инженерных конструкций (ГИК);

трансфекция клеток линии Chinese Hamster Ovary (СНО) полученными ГИК; получение моноклональных клеточных линий; проведение поиска лидерных клонов-продуцентов; разработка технологии культивирования продуцентов; изучение показателей роста и продуктивности клонов; изучение ряда показателей физико-химических свойств целевых белков.

Цель исследования: разработать технологию получения моноклональных клеточных линий-продуцентов активных рекомбинантных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы, и провести оптимизацию условий их культивирования.

Задачи исследования:

1. Трансфицировать клеточную линию СНО генно-инженерными конструкциями, кодирующими гены ферментов;
2. Провести ряд скринингов для отбора лидерных клонов-продуцентов по ростовым характеристикам и продуктивности;
3. Изучить ростовые характеристики и продуктивность лидерных клонов-продуцентов;
4. Изучить стабильность ростовых характеристик и продуктивность полученных клеточных линий в течение 60-ти генераций;
5. Подобрать условия суспензионного культивирования клонов-продуцентов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы для увеличения удельной активности и продуктивности клеточных линий;

Научная новизна:

1. Впервые в РФ созданы стабильные высокопродуктивные моноклональные клеточные линии-продуценты рекомбинантного лизосомального фермента арилсульфатазы В за счет коэкспрессии вспомогательного формилглицин генерирующего фермента. Полученные продуценты культивируют в суспензионных условиях без использования компонентов животного происхождения;
2. Впервые в РФ созданы стабильные высокопродуктивные моноклональные клеточные линии-продуценты рекомбинантного лизосомального фермента идуронат-2-сульфатазы. Полученные продуценты обладают способностью к росту в суспензионных условиях без использования компонентов животного происхождения;
3. Разработана технология суспензионного культивирования продуцентов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы для последующего использования в промышленном производстве;
4. На основании разработанного способа получения клеточных линий-продуцентов рекомбинантного лизосомального фермента арилсульфатазы В выдан патент на изобретение RU2020107533А «Клетка, продуцирующая с высокой эффективностью активный белок арилсульфатазу В, и способ получения этой клетки»;

Теоретическая и практическая значимость работы. Методология и подходы, связанные с созданием биофармацевтических препаратов на основе СНО, могут быть применены при разработке других биотехнологических процессов производства рекомбинантных белков медицинского назначения, в частности, к получению любых других ферментов подкласса сульфатаз.

Полученные клоны-продуценты рекомбинантных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы использованы в организации производства лекарственных препаратов для ферментной заместительной терапии МПС II и VI типов:

1. Данные, полученные в ходе исследований, включены в Паспорт главного банка клеток и в опытно-промышленный регламент ОНР №89761464-88-21 для производства фармацевтической субстанции на основе идуронат-2-сульфатазы;
2. Разработанная технология получения и культивирования продуцентов идуронат-2-сульфатазы и арилсульфатазы В, потенциальных биоаналогов препаратов «Наглазим» и «Элапраза» соответственно, использована при наработке серий фармацевтических субстанций для проведения доклинических и клинических испытаний;

Методология и методы исследования. Объектом исследования является разработка технологии получения клеточных линий-продуцентов арилсульфатазы В и идурона-2-сульфатазы на основе суспензионной клеточной линии СНО, культивируемой без применения любых компонентов животного происхождения. Предметом исследования является способ повышения продуктивности клеточных линий-продуцентов сложно экспрессируемых лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы с сохранением высокой удельной активности полученных ферментов. Теоретическая база данной работы основана на исследованиях российских и зарубежных ученых, материалов нормативной документации и патентов в области создания клеточных линий-продуцентов, оптимизации их условий культивирования, структуры и функциональных особенностей лизосомальных ферментов подкласса сульфатаз. При выполнении работы применяли различные молекулярно-биологические, биотехнологические, биохимические, физико-химические, иммунохимические и статистические методы исследования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Оптимизация состава питательной среды с добавлением сульфата меди и подбором режима фидирования обеспечивает получение фермента идуронат-2-сульфатазы с продуктивностью 300 мг/л;
2. Коэкспрессия вспомогательного фермента FGE приводит к повышению продуктивности клеточной линии-продуцента фермента арилсульфатазы В с 1-5 мг/л до 50–100 мг/л;
3. Увеличение продуктивности линии-продуцента арилсульфатазы В до 420 мг/л достигается оптимизацией культивирования лидерного клона-продуцента коэкспрессирующего целевой фермент арилсульфатазу В и формилглицин генерирующий фермент, путем добавления в ростовую среду сульфата меди;

Степень достоверности и апробации результатов диссертации. Основные результаты исследований представлены на научных конференциях АО «ГЕНЕРИУМ» в июне 2018 г. и 2021 г.

Разработка продуцентов выполнена в 2016-2021 гг. в АО «ГЕНЕРИУМ» в отделе клеточной биологии департамента генно-инженерных биологических препаратов. Создание экспрессионных векторов проведено в Лаборатории молекулярной биологии и биохимии, выделение и очистка белка осуществлены в Отделе разработки процесса, физико-химические исследования выполнены в Отделе аналитических методов.

Личный вклад соискателя. Автором были получены линии-продуценты, включая финальные стабильные моноклональные клеточные линии-продуценты рекомбинантных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы на основе клеток линии СНО; проведена оптимизация культивирования клонов-продуцентов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы; создан исследовательский банк продуцентов; проведены исследования влияния коэкспрессии вспомогательного формилглицин генерирующего фермента на продуцентов арилсульфатазы В; написана патентная заявка

«Клетка, продуцирующая с высокой эффективностью активный белок арилсульфатазу В, и способ получения этой клетки»; проведен анализ и обработка результатов данных экспериментов; написаны и опубликованы ряд статей.

Публикации научных трудов. По материалам диссертационной работы опубликовано 4 научных работы, из которых 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК и выдан 1 патент на изобретение.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, описания собственных результатов исследований и их обсуждения, выводов, описания практического использования результатов, списка литературы. Диссертация изложена на 141 странице, включая 33 рисунка и 15 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 154 источника.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1.1 Обзор литературы (глава 1)

В обзоре литературы освещены вопросы особенности ферментов подкласса сульфатаз. Ферменты ASB и I2S относятся к подклассу ферментов сульфатаз, поэтому общий подход в разработке данных продуцентов схож. Для ферментативной активности, сульфатазам необходима посттрансляционная модификация, приводящая к превращению остатка цистеина (Cys) (Brandao T. et al., 2010; York D. et al., 2016), в активном центре сульфатазы в молекулу С- α -формилглицин (FGly) (Appel M.J. et al., 2015). Образование остатка FGly в активном сайте сульфатазы катализируется вспомогательным формилглицин генерирующим ферментом (EC 1.8.3.7, FGE) (Dickmanns A. et al., 2005). FGE локализуется в эндоплазматическом ретикулуме, где взаимодействует с развернутой вторичной структурой сульфатазы и модифицирует ее активный центр до FGly (Mariappan M. et al., 2005). Ген SUMF1 кодирует нуклеотидную последовательность вспомогательного белка FGE (Alam M. et al., 2015; Peng J. et al., 2015). Ко-фактором к ферменту FGE являются ионы меди (Appel M.J. et al., 2019).

В обзоре литературы также рассмотрен вопрос получения моноклональных клеточных линий с использованием роботов ClonePix и Cell Metrik, представлена схема разработки моноклональной клеточной линии, приведен обзор различных клеточных экспрессионных систем, используемых в биофармацевтическом производстве.

2.2 Материалы и методы исследования (глава 2)

В работе использовали клеточную линию СНО-К1, полученную из коллекции клеточных культур НИЦ "Курчатовский институт" (ГосНИИгенетика) и адаптировали ее условиям суспензионного культивирования (далее клеточная линия СНО). Клетки линии СНО культивировали в суспензионных условиях: +37⁰С, 5% CO₂, с поддержанием постоянной влажности более 75%. Стандартная посевная плотность клеток составляла 0,3 млн/мл. Ростовая среда – BalanCD CHO Growth A (BCD), (IrvineScientific, США). Плотность жизнеспособных клеток определяли в камере Фукса–Розенталя с использованием 0,1% раствора трипанового синего или с использованием автоматического счетчика клеток Countess II FL (Thermo Fisher Scientific, США). Расчет клеточных характеристик проводили по формулам из (Тимонова С.С. и др., 2019).

Применяли следующие методы исследования:

- молекулярные – создание экспрессионных векторов, несущих гены целевых ферментов ARSB, SUMF1, IDS; измерение уровня мРНК гена ARSB нормализованного на уровень генов домашнего хозяйства с помощью ПЦР в реальном времени;
- биотехнологические методы – работа с культурами клеток на основе линии CHO, проведение трансфекций, получение моноклональных клеточных линий продуцентов целевых ферментов, проведение оптимизации условий культивирования линий продуцентов, работа с роботизированными системами для получения клеточных линий продуцентов в формате минибореакторов, изучение стабильности ростовых и продукционных характеристик промышленных клонов-продуцентов;
- биохимические, физико-химические и иммунохимические методы – проведение иммуноферментного анализа для определения концентрации рекомбинантного целевого белка в культуральной жидкости, проведение электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и 2-меркаптоэтанола, вестерн-блот и дот-блот анализы, хроматографическая очистка целевых ферментов, определение удельной активности полученных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы;
- статистические методы – расчеты были выполнены в программе Graph Pad Prism 6 (с помощью методов One-Way ANOVA и t-test), если $p_{value} < 0,0001 = ****$, $p_{value} < 0,001 = ***$, $p_{value} < 0,01 = **$, $p_{value} < 0,05 = *$, ns – нет статистической разницы, данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. Для построения различных графиков и зависимостей использовали программу Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation).

2.3 Оборудование, использованное в работе

Система обессоливания воды Milli-Q Advantage EU (Helicon, США); ламинарный шкаф Logic ClasII Type A2 (Labconco, США); микроскоп Eclipse TS100 (Nicon, Япония); CO₂-инкубатор MCO-20AIC (Sanyo, Япония); центрифуга Centrifuge 5415D (Eppendorf, Германия); CO₂-инкубатор Multitron Pro (Infors HT, Швейцария); pH-метр/иономер SevenEasy S20K (Mettler Toledo, США); нагреватель-термостат сухоблочный DB-2A (IKA, Германия); промыватель для планшетов PW40 (BIO RAD, Франция); спектрофотометр Benchmark Plus Microplate (BIO RAD, США); весы аналитические CP124S (Sartorius, Германия); камера вертикального фореза Mini-Protean (BIO RAD, США); система полусухого переноса SEMI-DRY TRANSFER UNIT (BIO RAD, США); источник тока Electrophoresis Power Supply-EP6 601 (SERVA, Испания); система гель-документирования ChemiDoc XRS+Molecular Imager (BIO RAD, США); система трансфекции Neon Transfection System (Invitrogen, США); автоматическая система для скрининга и отбора колоний ClonePix FL (Genetix, США); роботизированная система биореакторов AMBR R3-141 (TAP Biosystems, Германия); масштабируемая система трансфекции STX (MaxCyte, США); высококонтрастная фотодокументирующая система для идентификации роста моноклональных клеточных линий Cell Metric (Solentim, Великобритания).

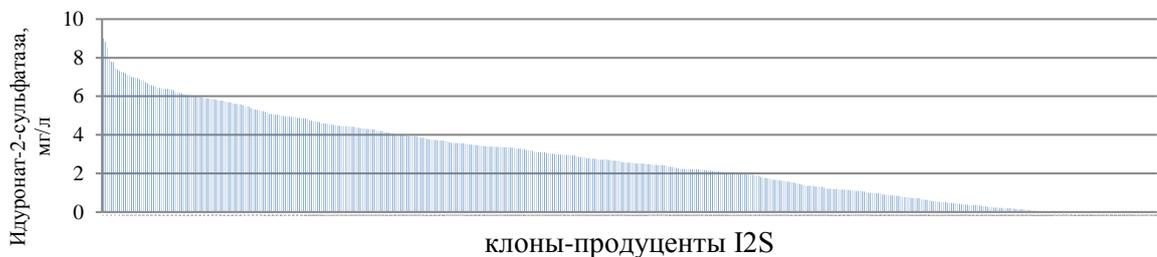
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Экспериментальные исследования изложены в 4 главах работы.

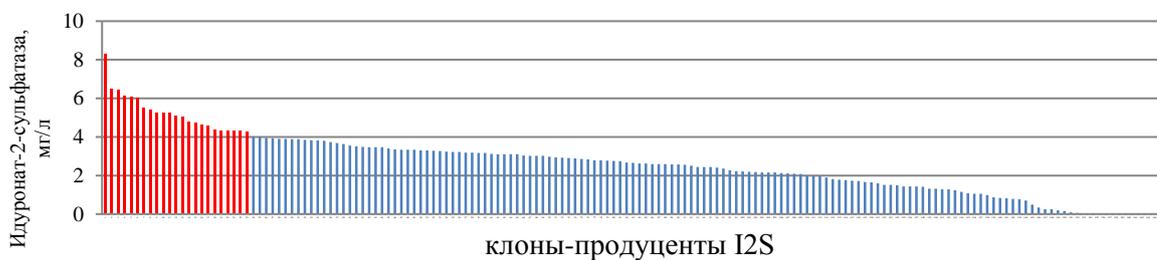
В главе 3 приведены исследования, посвященные разработке моноклональных клеточных линий и технологии их культивирования для промышленного производства рекомбинантного активного фермента идуронат-2-сульфатазы (I2S).

Клоны I2S были получены на автоматической система для скрининга и отбора колоний ClonePix. Для определения наиболее продуктивных моноклональных клеточных линий проводили скрининг культуральной жидкости (КЖ) клонов методом ИФА. Распределительная диаграмма по продуктивности для 1144 клонов из 96-ти луночных планшетов представлена на рис. 1–А. По результатам проведенного скрининга были выбраны 165 клонов с наибольшей продуктивностью для переноса в больший объем селективной ростовой среды. Затем, был проведен скрининг КЖ клонов по продуктивности методом ИФА 6-ти луночных планшетов (рис. 1-В), после чего 24 клон-производителя I2S адаптировали к шейкерному культивированию.

А



В



С

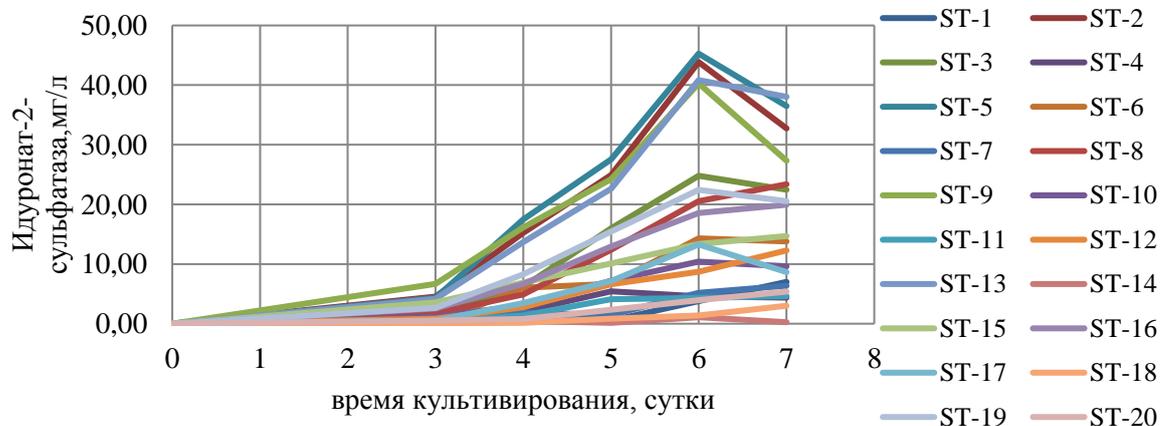


Рисунок 1. Диаграмма распределения продуктивности клонов во время скринингов методом ИФА: А – 96-ти луночных планшетов, мг/л; Б – 6-ти лун. планшетов, мг/л.

Красным выделены продуценты, адаптированные к условиям суспензионного культивирования; С – волюметрическая продуктивность, мг/л.

Клоны I2S оценивали по параметрам (Тимонова С.С. и др., 2019): динамика жизнеспособности культуры; динамика плотности жизнеспособных клеток; концентрация целевого фермента в КЖ (рис. 1–С); зависимость волюметрической продукции от кумулятивной плотности клеток. Максимальная продуктивность клонов составила 45 мг/л, клоны, имеющие продуктивность выше 40 мг/л: ST–5, ST–2, ST–13, ST–9.

В результате работы была получена панель клонов-продуцентов рекомбинантного лизосомального фермента I2S. Все клоны были криоконсервированы, и создан исследовательский клеточный банк продуцентов I2S на основе СНО. Дальнейший эксперимент проводили с лидерным клоном ST–5, который обладает высокой экспрессией и способностью образовывать высокую клеточную плотность в суспензии.

Затем проводили эксперименты, позволяющие увеличить удельную активность полученного фермента. Было проведено культивирование лидерного клона ST–5 в двух условиях: в среде BCD и в среде BCD с добавлением в 300 мкМ сульфата меди.

В результате добавление ионов меди в ростовую среду BCD не повлияло на динамику клеточной плотности (рис. 2–А) и жизнеспособности клона-продуцента I2S. Однако, значительное увеличение удельной активности целевого I2S, примерно в 2,5 раза с 4,8 ЕД/мкг до 12 ЕД/мкг, у клона-продуцента ST–5 наблюдали при культивировании клеток с добавлением в ростовую среду BCD сульфата меди (рис. 2–В). Также наблюдали увеличение продуктивности клона-продуцента ST–5, примерно на 30% с 120 мг/л до 180 мг/л (рис. 2–С), при добавлении ионов Cu^{2+} в ростовую среду.

Этот эксперимент наглядно подтверждает гипотезу о влиянии ионов Cu^{2+} на вспомогательный белок FGE, который в свою очередь влияет на активность лизосомального фермента I2S во время биосинтеза белка. Дальнейшие эксперименты проводили с добавлением ионов Cu^{2+} в ростовую среду для повышения активности I2S и продуктивности клона-продуцента.

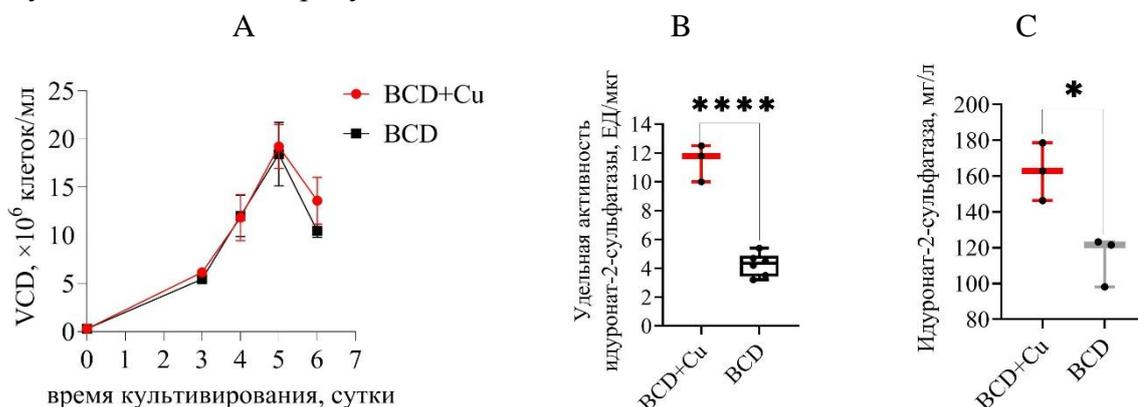


Рисунок 2. Оптимизация состава ростовой среды для клона-продуцента I2S при культивировании в режиме batch. А – плотность жизнеспособных клеток, 10^6 клеток/мл; В – удельная специфическая активность фермента I2S, ЕД/мкг; С – продуктивность клона-продуцента I2S на 12 сутки культивирования, мг/л; (n=3), данные представлены в виде среднего значения и \pm стандартной ошибки среднего (SEM).

Далее проводили оптимизацию процесса культивирования клон-производителя идурунат-2-сульфатазы с целью подбора оптимального компонента для фидирования. Было проведено культивирование в режиме fed-batch для подбора наиболее оптимального компонента подпитки: feed 2, feed 3 или feed 4. Клон культивировали в минибиореакторах ambr® 15 cell culture, что позволило имитировать процесс культивирования в промышленном биореакторе и обеспечить условия, оптимальные для роста культур клеток. Исходя из предыдущего эксперимента, для активности фермента I2S в ростовую среду было добавлено 300 мкМ сульфата меди.

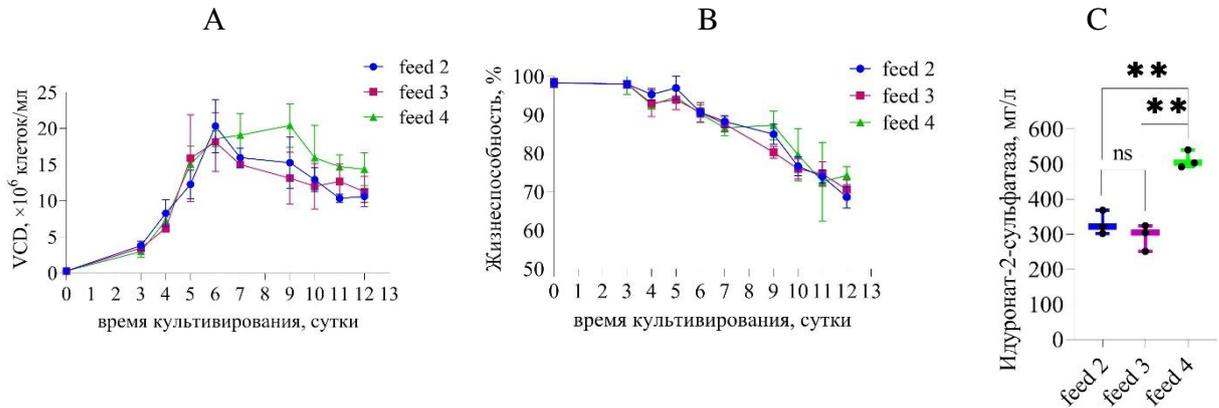


Рисунок 3. Оптимизация культивирования клон I2S в режиме fed-batch. А – плотность жизнеспособных клеток, 10^6 клеток/мл; В – продуктивность клон I2S на 12 сутки культивирования, мг/л; (n=3), данные представлены в виде среднего значения и \pm стандартной ошибки среднего (SEM).

Наблюдали одинаковую динамику роста плотности жизнеспособных клеток при добавлении feed 2 и feed 3, при добавлении feed 4 была замечена опережающая динамика увеличения плотности жизнеспособных клеток (рис. 3–А). Динамика жизнеспособности культуры не отличалась (рис. 3–В). Самую высокую экспрессию целевого белка I2S наблюдали при культивировании с использованием подпитки feed 4 – около 500 мг/л, затем feed 2 – около 330 мг/л и feed 3 – около 290 мг/л (рис 3–С).

В результате был подобран оптимальный компонент для подпитки клон: feed 4, который позволил увеличить экспрессию целевого I2S на 60% до 0,5 г/л (рис. 3–В).

Дальнейшие эксперименты проводили по оптимизации условий фидирования и выбора температурного режима культивирования для лидерного клон-производителя I2S с добавлением подпитки feed 4 в ростовую среду и ионов Cu^{2+} . Культивирование проводили в минибиореакторах ambr® 15 cell culture. Использовали два базовых условия: культивирование без снижения температуры при $+37^\circ\text{C}$ и со снижением температуры на 6-е сутки до $+32^\circ\text{C}$. Схема режима фидирования представлена в табл. 2.

В результате культивирования клон в режиме fed-batch в 24-х условиях, была получена высокая продуктивность клон со снижением температуры до $+32^\circ\text{C}$ от 0,8 г/л до 1,3 г/л. Для культивирования клон без снижения температуры экспрессия целевого белка составила от 0,15 г/л до 0,32 г/л (рис. 4–А).

Таблица 2 – Схема фидирования процесса fed–batch культивирования для лидерного клона I2S. Условия 8–32 К использовали в качестве контроля.

Feeding schedule Options, ambr station													
№ условия фидирования		1 сут	2 сут	3 сут	4 сут	5 сут	6 сут	7 сут	8 сут	9 сут	10 сут	11 сут	12 сут
1–32	13–37	1,0%	1,5%	2,0%	2,5%	3,0%	3,5%	4,0%	4,5%	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%
2–32	14–37		1,0%	1,5%	2,0%	2,5%	3,0%	3,5%	4,0%	4,5%	5,0%	5,0%	5,0%
3–32	15–37	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%
4–32	16–37		2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%
5–32	17–37			2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%
6–32	18–37	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%
7–32	19–37		3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%
8–32	20–37			3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%
9–32	21–37				3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%
10–32	22–37			4%	4%	4%	4%	4%	4%	4%	4%	4%	4%
11–32	23–37				4%	4%	4%	4%	4%	4%	4%	4%	4%
12–32	24–37				5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%

Эффективность заместительной ферментной терапии, полученным белком I2S, будет зависеть от удельной активности лизосомального фермента, поэтому данная характеристика фермента является ключевой в разработке процесса культивирования. Продуктивность процесса культивирования в режиме fed–batch со снижением температуры позволяет получить высокий выход продукта, однако при данном процессе культивирования клон наблюдается более низкая специфическая активность этого фермента – около 15 ЕД/мкг. При культивировании клон в режиме fed–batch без снижения температуры максимальная продуктивность составляет 0,32 г/л, однако при данном условии наблюдается значительное повышение удельной активности полученного I2S до 35 ЕД/мкг (рис. 4–В).

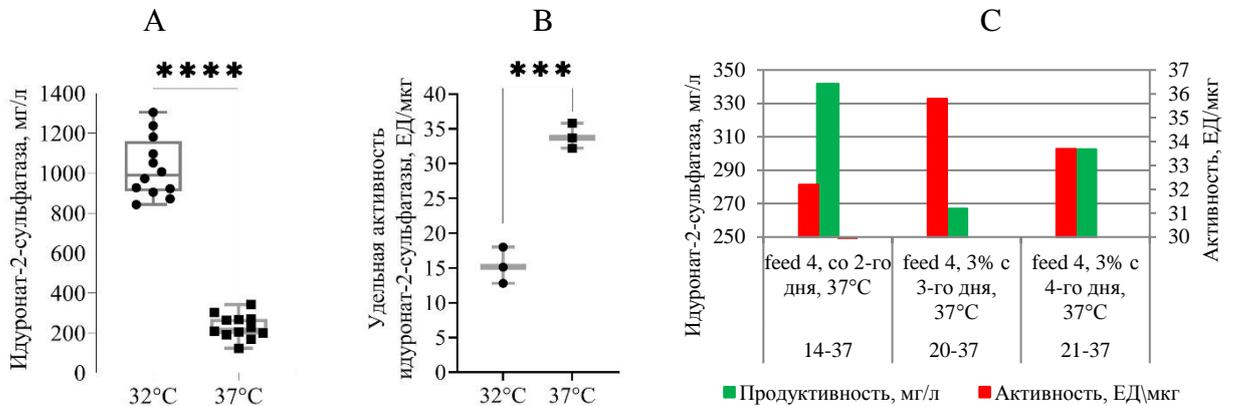


Рисунок 4. Анализ результатов продуктивности лидерного клона I2S и активности очищенного фермента I2S во время культивирования с подпиткой: А – продуктивность, мг/л; В – удельная активность выделенного фермента I2S, ЕД/мкг; (n=12), данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения, Pvalue<0,0001. С – продуктивность и специфическая активность целевого фермента I2S лидерных условий, 37°C; расшифровку условий культивирования смотри в табл. 2.

Анализируя результаты исследования для процесса культивирования клон-производителя I2S, можно сделать вывод о том, что оптимальный процесс культивирования для данного фермента необходимо проводить без снижения температурного режима, чтобы удельная активность фермента оставалась высокой. В результате эксперимента был выбран

режим культивирования 20–37 (см. таб. 2). Продуктивность клона при данном условии – 260 мг/л, специфическая активность целевого фермента – 35,8 ЕД/мкг (рис. 4–С).

Глава 4 посвящена получению моноклональных клеточных линии рекомбинантного фермента арилсульфатазы В. Клон-продуцент ASB получали методом предельного разведения с подтверждением моноклональности на системе Cell Metric (Solentim). Далее проводили изучение влияния сульфата меди и хлорида кальция на продуктивность, ростовые характеристики и метаболизм полученного клона-продуцента ASB. Культивирование клона-продуцента ASB проводили в трех условиях: в стандартной ростовой среде (контроль), с добавлением 300 мкМ сульфата меди и с добавлением 300 мкМ сульфата меди и 300 мкМ хлорида кальция.

В своей структуре фермент ASB имеет ион двухвалентного металла, предположительно Ca^{2+} . Роль иона металла заключается в стабилизации образования сложного промежуточного сульфатного эфира во время конверсии Cys в fGly. В качестве дополнительного компонента ростовой среды в следующем эксперименте использовали хлорид кальция. Во всех условиях не наблюдали изменения ростовых характеристик клона на протяжении культивирования (рис. 5–А). Несмотря на отсутствие отличий плотностей жизнеспособных клеток клона-продуцента ASB в разных условиях культивирования, было выявлено 3-х кратное увеличение волюметрической продуктивности клеточной линии с 2 до 6 мг/л и повышение специфической продуктивности клеток с 0,04 до 0,12 пг/клетка/сут при добавлении в ростовую среду сульфата меди (рис. 5–В, С). Ферментативная активность ASB в КЖ оказалась в 2,5 раза выше при культивировании клеток в среде с добавлением двух компонентов в сравнении со стандартной средой (рис. 5–D).

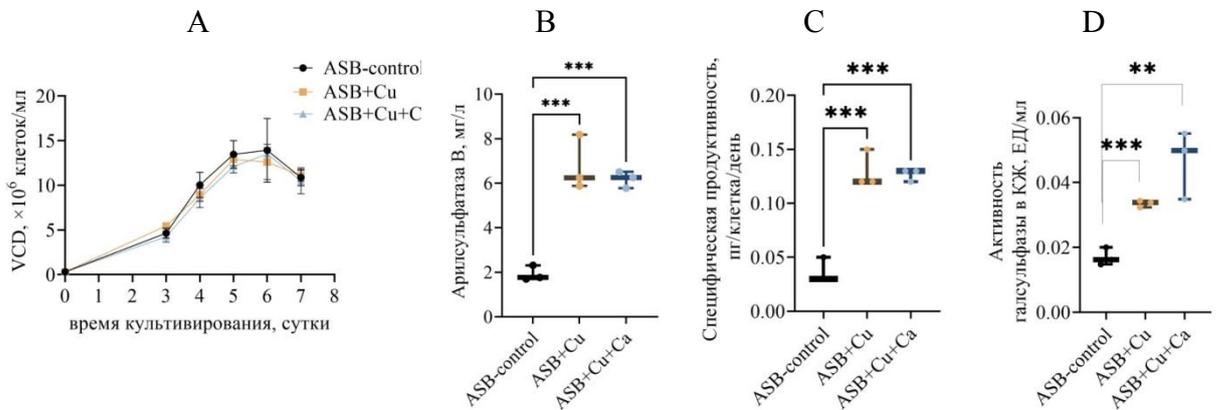


Рисунок 5. Характеристики клона-продуцента ASB в процессе batch культивирования. А – жизнеспособность клеток, %; В – плотность жизнеспособных клеток, 10^6 клеток/мл; С – волюметрическая продуктивность, мг/л; D – специфическая продуктивность клеток, пг/клетка/сут; Е – активность фермента ASB в КЖ, ЕД/мл. ASB – control – клон-продуцент ASB культивируемый на среде BCD; ASB – Cu – клон-продуцент ASB культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди; ASB – Cu+Ca – клон-продуцент ASB культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди и хлорида кальция; (n=3). Pvalue рассчитывали с помощью one – way ANOVA test, используя в качестве контроля группу ASB – control (*Pvalue < 0.05, **Pvalue < 0.01, ***Pvalue < 0.001, ****Pvalue < 0.0001).

Полученные результаты соотносятся с литературными данными о роли иона Cu^{2+} как кофактора вспомогательного белка FGE для посттрансляционной модификации остатка Cys в активном центре ASB (Appel M.J. et al., 2015; York D. et al., 2016).

Для изучения влияния FGE на экспрессию и активность ASB, была проведена трансфекция клона-продуцента ASB плазмидой, несущей ген вспомогательного фермента FGE, который участвует в посттрансляционной модификации активного центра ASB. Полученную клеточную линию, экспрессирующую ASB+FGE сравнивали с исходной клеточной линией ASB.

Плотность жизнеспособных клеток и жизнеспособность продуцентов клеток ASB и ASB+FGE в ходе сравнительного культивирования оказалась схожей (рис. 6–А, В), при этом наблюдали значительное увеличение как волюметрической, так и специфической продуктивности клеток ASB+FGE (рис. 6–С, D). По результатам ИФА, продуктивность клона ASB составила 3–5 мг/л, а продуктивность клона ASB+FGE – 25 мг/л (рис. 6–С). Увеличение продуктивности клеток ASB+FGE также подтверждено вестерн-блот анализом образцов КЖ (рис. 6–F–G).

По литературным данным известно, что белок FGE локализован в эндоплазматическом ретикулуме, где он принимает участие в посттрансляционной модификации активного центра сульфатазы, поэтому для подтверждения экспрессии экзогенного FGE у клона-продуцента ASB+FGE проводили вестерн-блот анализ клеточных лизатов (рис. 6–H, I). Уровень эндогенного FGE у нетрансфицированных клеток оказался ниже предела детекции (рис. 6–H, треки 2–4), специфическое окрашивание экзогенного FGE подтверждает тот факт, что коэкспрессия двух ферментов приводит к повышению продуктивности клеточной линии (рис. 6–H, треки 5–7; рис. 6–G, треки 5–7).

Для оценки влияния экспрессии экзогенного FGE на уровень мРНК гена ASB была проведена количественная ПЦР в реальном времени (qPCR) (рис. 6–E). В результате было показано, что уровни мРНК гена ASB у клеток клона ASB и клеток клона ASB+FGE статистически не различаются. При этом, как было показано ранее, уровень экспрессии секретируемого белка ASB в культуральную жидкость у этих клеточных линий отличается значительно (рис. 6–C).

При совокупности полученных экспериментальных данных мы предполагаем следующий механизм повышения экспрессии ASB за счет коэкспрессии вспомогательного белка FGE. Сверхэкспресированный ASB не может быть в достаточной мере модифицирован за счет низкого уровня эндогенного фермента FGE в клетках CHO. Немодифицированный ASB, по-видимому, не секретируется из клеток и утилизируется клеточным аппаратом. Экспрессия же экзогенного FGE в клетках CHO значительно повышает количество модифицированного ASB, способного пройти через секреторный аппарат клеток в культуральную жидкость.

Таким образом, с помощью коэкспрессии вспомогательного белка FGE, участвующего в модификации активного центра ASB, удалось увеличить продуктивность клеточной линии целевого фермента в 10 раз до 25 мг/л (рис. 6–C).

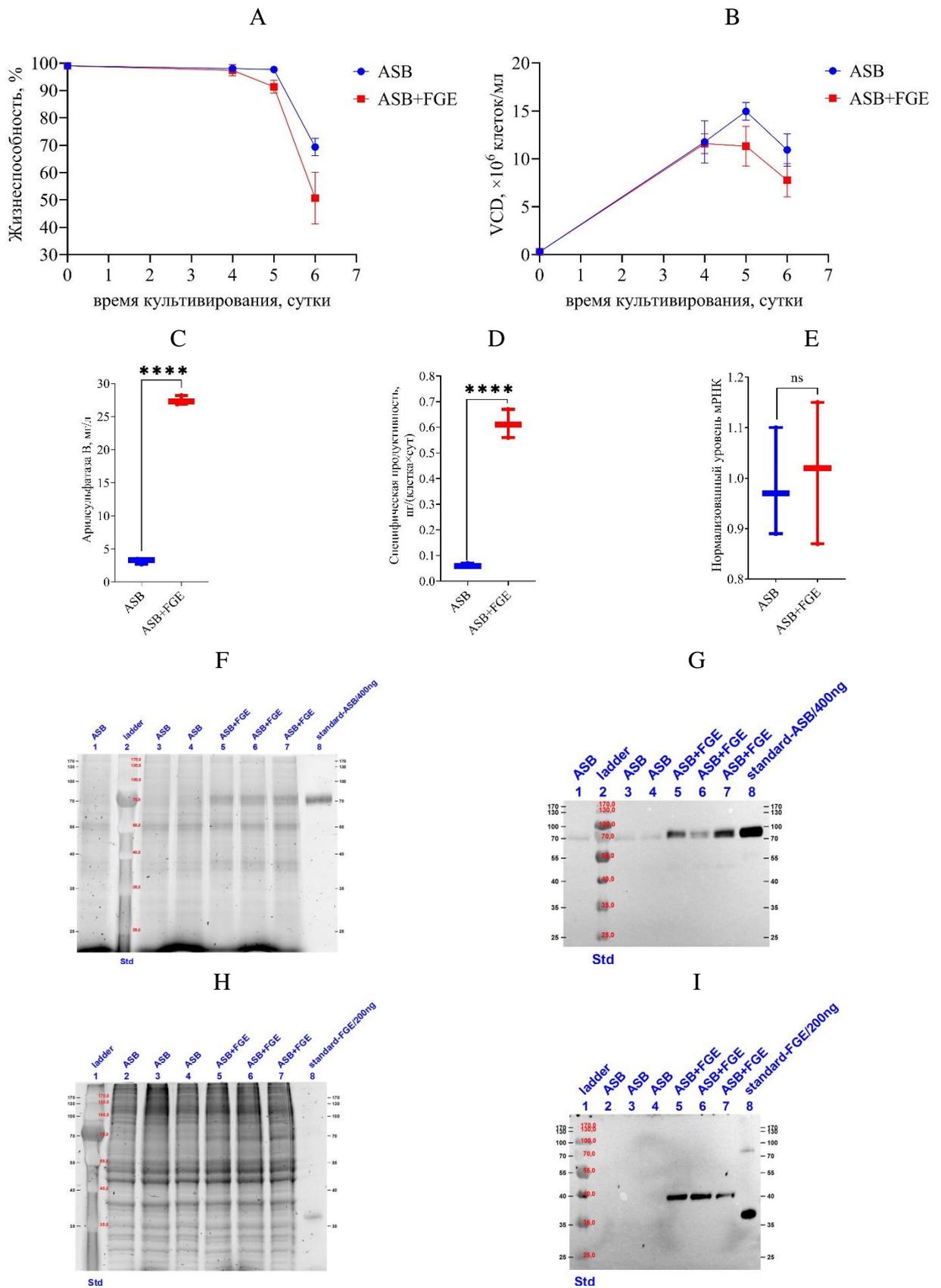


Рисунок 6. Характеристики клона-продуцента ASB после супертрансфекции геном SUMF1; А – жизнеспособность клеток, %; В – плотность жизнеспособных клеток, 10^6 клеток/мл; С – продуктивность клеток, мг/л; D – специфическая продуктивность клеток, пг/клетка/сут; Е – электрофорез КЖ, 20 мкл/трек; F – вестерн-блот анализ КЖ, антитела anti – ASB (АО «ГЕНЕРИУМ», РФ); G – электрофорез лизатов, 2×10^5

клеток/трек; Н вестерн-блот анализ лизатов, антитела к FGE (ab 178809, Abcam); I – нормализованный уровень мРНК; standard FGE – рекомбинантный FGE (ab115708, Abcam); standard ASB – рекомбинантный ASB (Наглазим, BioMarin). ASB – клон-продуцент ASB; ASB+FGE – клон ASB после супертрансфекции геном SUMF1; (n=3), данные представлены в виде среднего значения и \pm SEM.

Глава 5 посвящена разработке высокопродуктивной клеточной линии-продуцента коэкспрессирующей арилсульфатазу В и формилглицин генерирующий фермент для промышленного производства лекарственного препарата арилсульфатазы В.

Для получения высокопродуктивных клеточных линий, как исходного субстрата в производстве лекарственного препарата на основе ASB, была проведена котрансфекция клеток родительской линии CHO в различных вариантах. В первом варианте (контроль) использовали одну плазмиду с геном целевого фермента ASB. В других вариантах котрансфекцию проводили с использованием разных соотношений двух плазмид, кодирующих гены ASB и FGE (табл. 3).

Таблица 3 – Соотношение плазмид во время трансфекции.

Варианты трансфекции	Соотношение плазмид, кодирующих гены ферментов ASB и FGE
1	ASB
2	ASB 50%+ FGE 50%
3	ASB 66,6%+ FGE 33,3%
4	ASB 90%+ FGE 10%

После селекции в среде с антибиотиком проводили последовательные скрининги минипулов на стадиях 96- и 6-луночных планшетов. Продуктивность минипулов уже на стадии 96-ти луночных планшетов была выше у продуцентов коэкспрессирующих ASB+FGE (рис. 7–А).

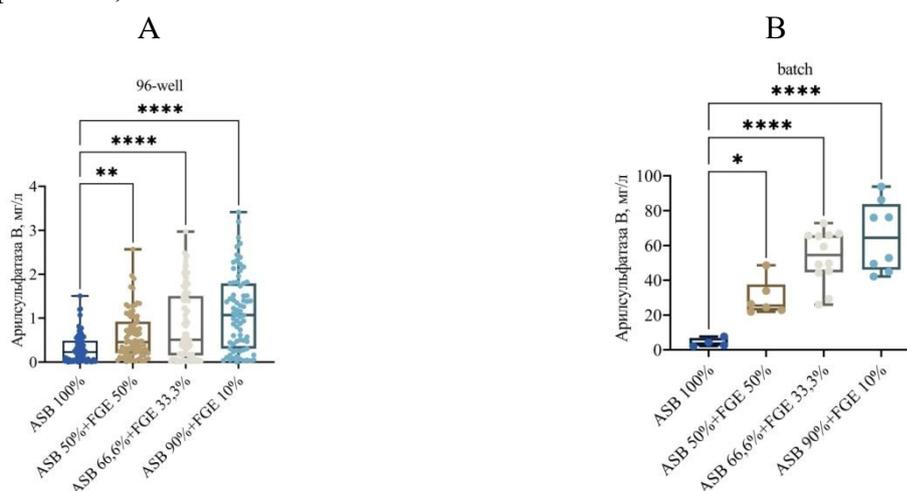


Рисунок 7. Продуктивность минипулов в зависимости от разного соотношения плазмид с генами, кодирующими ASB и FGE; А – продуктивность во время скрининга 96 – луночных планшетов, мг/л; В – волюметрическая продуктивность в условиях культивирования batch 6 дней, мг/л; ASB+FGE – минипулы, трансфицированные двумя

плазмидами, несущими гены ARSB и SUMF1; ASB – минипулы, трансфицированные одной плазмидой, несущей ген ARSB.

Для оценки роста и продуктивности минипулов проводили периодическое культивирование продуцентов. Минипулы ASB имели продуктивность до 10 мг/л, минипулы, коэкспрессирующие ASB+FGE имели продуктивность до 100 мг/л (рис. 7–В). В результате эксперимента наблюдали увеличение продуктивности ASB у минипулов с увеличением доли плазмиды, несущей ген целевого фермента ASB 90% и FGE 10% (рис. 7–А–В, табл. 3).

Для получения высокопродуктивных моноклональных клеточных линий лидерный минипул-продуцент ASB+FGE был клонирован в полутвердой среде, после чего проведен отбор клонов с помощью робота ClonePix. В результате работы была получена панель клонов-продуцентов рекомбинантного лизосомального фермента ASB с вспомогательным ферментом FGE. Все клоны были криоконсервированы и создан исследовательский банк клонов-продуцентов.

Далее разработка процесса культивирования клонов продвигалась в направлении оптимизации условий процесса: поиск подходящих ростовых сред, подкормок, температурного режима культивирования и т. д. Провели изучение влияния хлорида кальция и сульфата меди на ростовые и продукционные характеристики клонов-продуцентов ASB+FGE в среде с различными вариантами добавок (рис. 8).

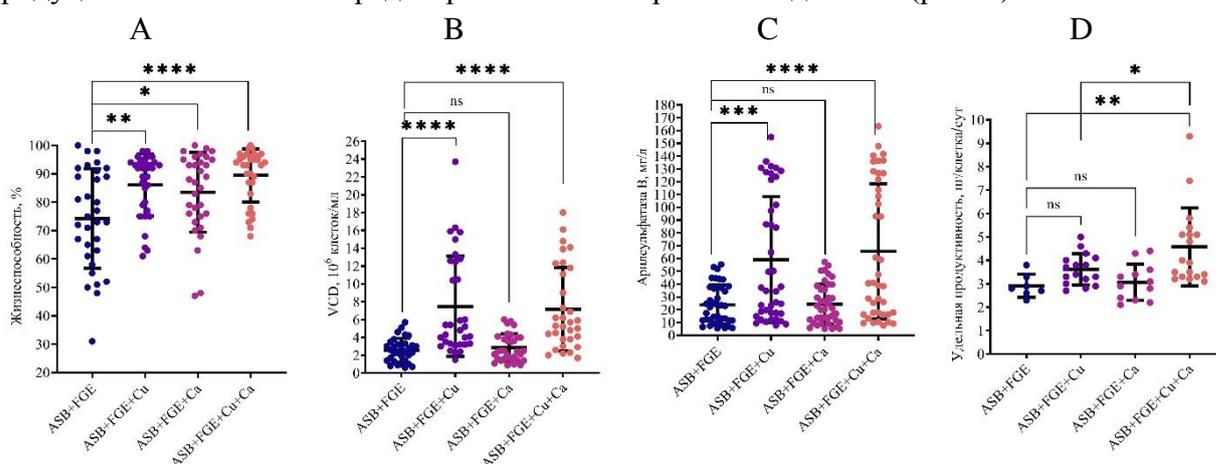


Рисунок 8. Характеристики клонов-продуцентов коэкспрессирующих ферменты ASB и FGE в процессе batch культивирования на 4–7 сутки. А – жизнеспособность клеток, %; В – плотность жизнеспособных клеток, 10^6 клеток/мл; С – волюметрическая продуктивность, мг/л; D – специфическая продуктивность клеток, пг/клетка/сут; ASB+FGE – клоны-продуценты коэкспрессирующие ферменты ASB+FGE культивируемые на среде BCD; ASB+FGE+Cu – клоны-продуценты коэкспрессирующие ферменты ASB+FGE культивируемые на среде BCD с добавлением сульфата меди; ASB+FGE+Ca – клоны-продуценты коэкспрессирующие ферменты ASB+FGE культивируемые на среде BCD с добавлением хлорида кальция; ASB+FGE+Cu+Ca – клоны-продуценты коэкспрессирующие ферменты ASB+FGE культивируемые на среде BCD с добавлением сульфата меди и хлорида кальция; (n=32), данные Pvalue рассчитывали с помощью one – way ANOVA test, используя в качестве контроля группу ASB+FGE (*Pvalue < 0.05, **Pvalue < 0.01, ***Pvalue < 0.001, ****Pvalue < 0.0001).

Наблюдали повышение жизнеспособности клонов-продуцентов ASB+FGE, увеличение плотности жизнеспособных клеток и продуктивности клонов до 150 мг/л при добавлении сульфата меди в ростовую среду (рис. 8–А, В, С). Следует отметить, что добавление хлорида кальция, как отдельного компонента в ростовую среду, не влияет на клеточную плотность и продуктивность культур (рис. 8–В–С), однако, с добавлением в ростовую среду сразу двух компонентов, влияющих на активные центры белков ASB и FGE, наблюдали рост специфической продуктивности клонов-продуцентов ASB+FGE до значений $4,58 \pm 1,62$ пг/(клетка×сут) по сравнению с вариантом культивирования в присутствии сульфата меди $3,62 \pm 0,64$ пг/(клетка×сут) (рис. 8–D).

Таким образом, в результате проведенного эксперимента было продемонстрировано, что добавление в ростовую среду 300 мкМ сульфата меди и 300 мкМ хлорида кальция может положительно влиять на специфическую продуктивность и жизнеспособность клонов-продуцентов ASB+FGE.

В дальнейшей работе культивирование лидерного клона-продуцента ASB+FGE проводили длительностью 12 суток в трех вариантах: в стандартной ростовой среде (контроль), с добавлением 300 мкМ сульфата меди, с добавлением 300 мкМ сульфата меди и 300 мкМ хлорида кальция.

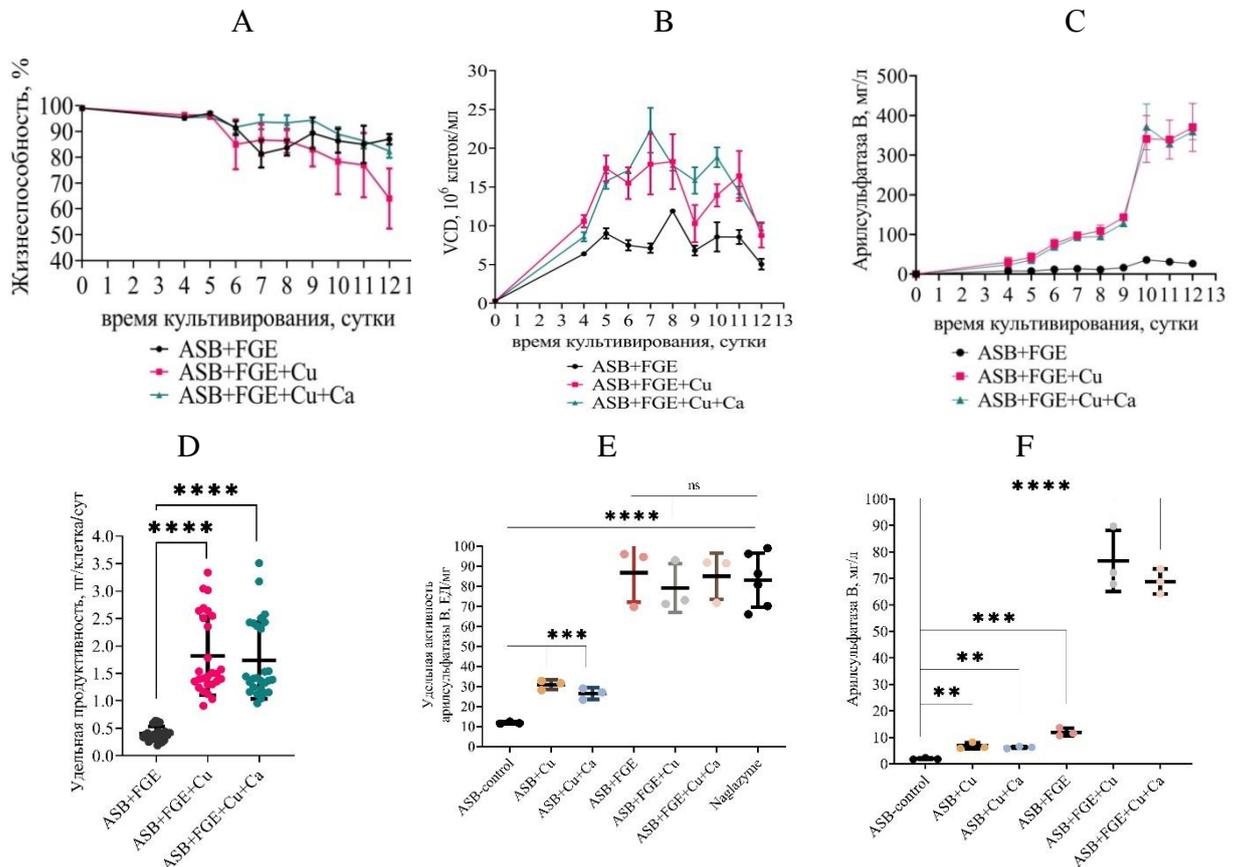


Рисунок 9. Характеристики лидерного клона, коэкспрессирующего ферменты ASB и FGE в процессе fed-batch культивирования и активность очищенного полученного препарата ASB. А – жизнеспособность клеток, %; В – плотность жизнеспособных клеток, 10⁶ клеток/мл; С – продуктивность клеток, мг/л; D – специфическая продуктивность клеток на 12 сутки культивирования, пг/клетка/сут; E – специфическая активность фермента ASB после хроматографической очистки, ЕД/мг; F – продуктивность клеточных линий-продуцентов на 6 сутки культивирования. ASB – control – клон-продуцент ASB

культивируемый на среде BCD; ASB – Cu – клон-продуцент ASB культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди; ASB – Cu+Ca – клон-продуцент ASB культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди и хлорида кальция; ASB+FGE+Cu – клон-продуцент коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди; ASB+FGE+Ca – клон-продуцент коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE культивируемый на среде BCD с добавлением хлорида кальция; ASB+FGE+Cu+Ca – клон-продуцент коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди и хлорида кальция; (n=3). Pvalue рассчитывали с помощью one – way ANOVA test, (*Pvalue < 0.05, **Pvalue < 0.01, ***Pvalue < 0.001, ****Pvalue < 0.0001), в качестве контроля использовали группы ASB+FGE и ASB – control.

Максимальную жизнеспособность в ходе культивирования наблюдали при условии добавления сульфата меди и хлорида кальция, которая составляла $\leq 80\%$ на 12 сутки культивирования (рис. 9–А). В ходе эксперимента было показано, что клеточная плотность в контрольных условиях ниже, чем при добавлении сульфата меди и хлорида кальция, $\sim 1,0 \times 10^7$ и $\sim 2,0\text{--}2,5 \times 10^7$ клеток/мл соответственно (рис. 9–В). Возможным объяснением данного эффекта является то, что исходных концентраций ионов кальция и меди в ростовой среде недостаточно для конверсии больших количеств сверхэкспрессированной лизосомальной сульфатазы ASB, ее правильного фолдинга и последующей секреции в культуральную жидкость. Скорее всего, неактивный ASB с неправильным фолдингом накапливается в эндоплазматическом ретикулуме или цитоплазме, и, как следствие, оказывает токсическое действие на клетку (рис. 9–В) (Christianson T.M. et al., 2004).

Добавление в ростовую среду сульфата меди привело к повышению волюметрической и специфической продуктивности клон-продуцента ASB+FGE: в 10 раз до 420 мг/л и в 6 раз до 3 пг/клетка/сут соответственно, в сравнении с контрольными условиями (рис. 9–С–D). Максимальный выход фермента достигается при добавлении сульфата меди в ростовую среду продуцентов ASB+FGE (рис. 9-F) предположительно за счет повышения активности FGE, который в свою очередь модифицирует активный центр ASB, что может способствовать правильному формированию ее пространственной структуры.

Удельная активность хроматографически очищенного препарата ASB, полученного в результате культивирования в контрольных условиях (культивирование клон ASB без добавок солей металлов), в среднем составила около 11,9 ЕД/мг. Добавление Cu^{2+} увеличивает активность фермента приблизительно в 3 раза до 30 ЕД/мг. Благодаря коэкспрессии белков ASB и FGE, удалось повысить удельную активность ASB в 7 раз до 70–90 ЕД/мг. Активность полученного фермента ASB, в этом случае, соответствует активности коммерчески доступного препарата сравнения «Наглазим» (рис. 9-E).

В результате проведенных исследований можно сделать вывод о том, что коэкспрессия ферментов ASB и FGE, а также добавление в ростовую среду сульфата меди приводит к улучшению ростовых и продукционных свойств клеточной линии. Полученный клон-продуцент и разработанные условия культивирования могут быть использованы для производства лекарственного препарата для ФЗТ МПС VI типа. Разработанная технология позволила решить технологическую проблему низкого выхода лизосомальной сульфатазы, характерную для препаратов подобного класса, и значительно снизила себестоимость производства.

В главе 6 экспериментально показано, что полученные промышленные моноклональные клоны-продуценты рекомбинантных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы сохраняют стабильные показатели роста и продуктивности при культивировании более 60-ти генераций (рис. 10-А, В). Статистически значимого снижения продуктивности выявлено не было (рис. 10-С, D).

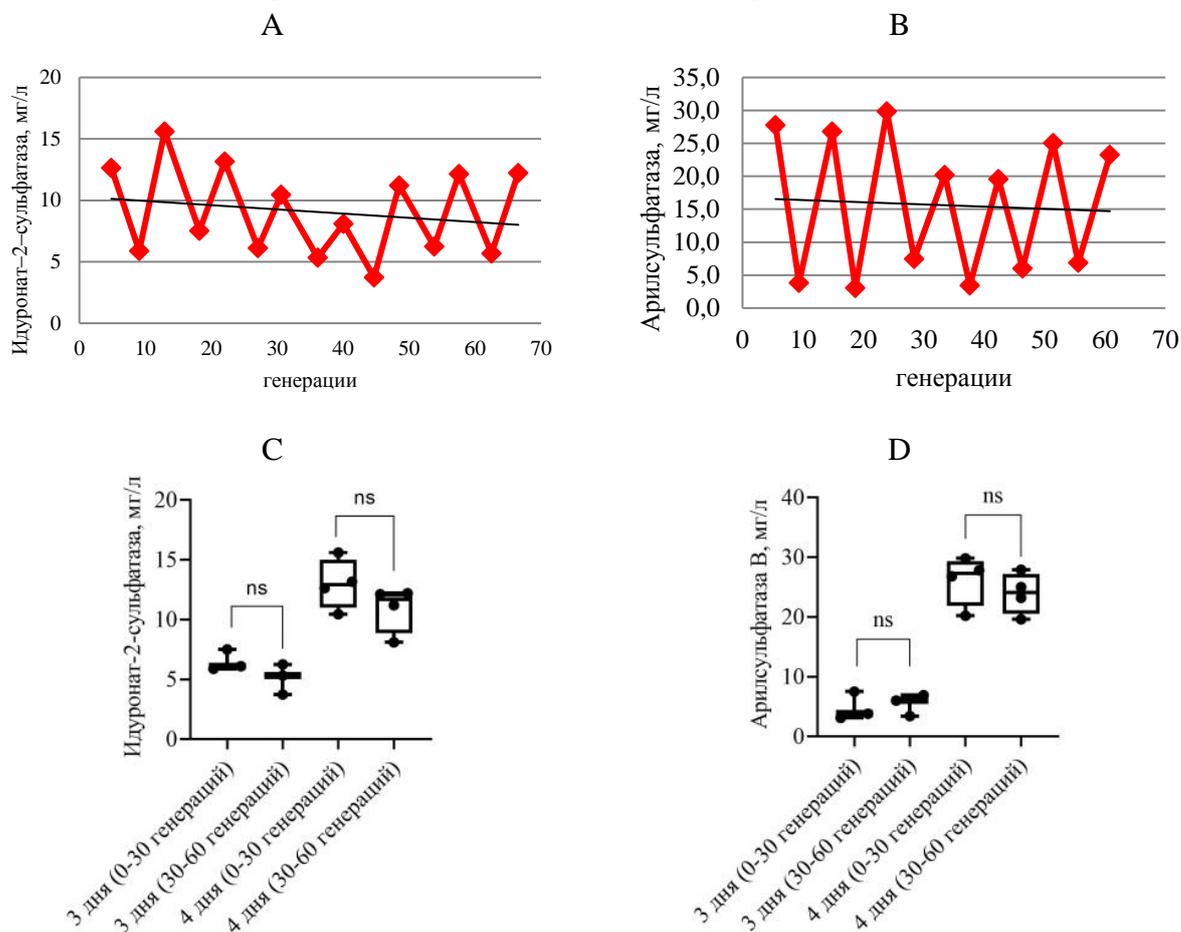


Рисунок 10. Исследование роста и продуктивности промышленных клонов-продуцентов I2S и ASB+FGE в течение 60 генераций. А – динамика волюметрической продуктивности клона-продуцента I2S, мг/л; В – динамика волюметрической продуктивности клона-продуцента ASB+FGE, мг/л; С – сравнение продуктивности на ранних и поздних генерациях по t-критерию Стьюдента для 3 и 4 дней рутинных пересевов культуры клона-продуцента I2S; D – сравнение продуктивности на ранних и поздних генерациях по t-критерию Стьюдента для 3 и 4 дней рутинных пересевов культуры клона-продуцента ASB+FGE. (n=3). Pvalue рассчитывали с помощью unpaired t test, (*Pvalue < 0.05, **Pvalue < 0.01, ***Pvalue < 0.001, ****Pvalue < 0.0001, ns – нет статистического различия).

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных исследований разработана технология получения моноклональных клеточных линий-продуцентов активных рекомбинантных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы для создания отечественных препаратов против МПС II и VI типов. Все полученные клеточные линии культивируются в виде суспензии, без использования сыворотки или других компонентов животного происхождения. Предложен и экспериментально обоснован способ

культивирования полученных промышленных клонов-продуцентов ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы в результате чего повышена продуктивность клеточных линий и активность целевых ферментов. Данный способ получения и оптимизации условий культивирования продуцентов можно использовать для получения препаратов класса лизосомальных ферментов, в частности сульфатаз.

5. ВЫВОДЫ

1. Проведена трансфекция клеточной линии СНО целевыми плазмидами, кодирующими гены целевых ферментов (ARSB, IDS);
2. Проведено изучение ряда показателей, характеризующих моноклональные клеточные линии, выявлены лидерные кандидаты для исследований;
3. Получен промышленный стабильный клон-продуцент идуронат-2-сульфатазы и проведена оптимизация условий его культивирования:
 - 3.1 Оптимизирован состав питательной среды, в результате которого удельная активность лизосомального фермента идуронат-2-сульфатазы была увеличена до 12 ЕД/мкг, за счет добавления в ростовую среду ионов Cu^{2+} , которые являются кофактором реакции превращения Cys в fGly , в активном центре целевого фермента идуронат-2-сульфатазы;
 - 3.2 Проведено культивирование на системе минибиореакторов ambr® 15 cell culture AMBR, в результате которого подобран компонент feed 4, позволяющий увеличить экспрессию активного фермента идуронат-2-сульфатазы до 0,5 г/л;
 - 3.3 Проведен подбор температурного режима и режима фидирования компонента feed 4 в процессе культивирования на системе минибиореакторов ambr® 15 cell culture AMBR, для достижения максимальной продуктивности лизосомального фермента идуронат-2-сульфатазы и сохранения его высокой удельной активности 30–35 ЕД/мкг;
4. Получен промышленный стабильный клон-продуцент арилсульфатазы В коэкспрессирующий внутриклеточный вспомогательный формилглицин генерирующий фермент:
 - 4.1 Увеличена продуктивность низкопродуктивной клеточной линии ASB с 2-3 мг/л до 25 мг/л с помощью дополнительной трансфекции геном SUMF1, который кодирует вспомогательный формилглицин генерирующий фермент, участвующий в трансформации активного центра арилсульфатазы В;
 - 4.2 Получены высокопродуктивные клоны-продуценты коэкспрессирующие арилсульфатазу В и формилглицин генерирующий фермент (40–50 мг/л вместо 3–5 мг/л), с сохранением высокой удельной активности фермента арилсульфатазы В;
 - 4.3 Благодаря оптимизации условий культивирования клон-продуцента коэкспрессирующего арилсульфатазу В и формилглицин генерирующий фермент, была достигнута продуктивность 420 мг/л, за счет добавления в ростовую среду ионов Cu^{2+} , входящих в состав активного центра вспомогательного формилглицин генерирующего фермента с сохранением высокой удельной активности целевого фермента арилсульфатазы В около 80–100 ЕД/мг;
5. В результате проведения диссертационной работы созданы высокопродуктивные стабильные моноклональные клеточные линии–продуценты терапевтических рекомбинантных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы для получения препаратов против мукополисахаридоза II и VI типов;

6. Снижена себестоимость производства рекомбинантных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы;

6. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработанные стабильные моноклональные клеточные линии и технология их культивирования будут использованы на производстве для получения фармацевтической субстанции рекомбинантных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы для терапии против МПС II и VI типов.

Способ получения продуцентов с помощью коэкспрессии основного и вспомогательных белков можно использовать при разработке аналогичных рекомбинантных белковых препаратов.

Создание отечественных препаратов на основе рекомбинантных ферментов будет способствовать реализации государственной политики по развитию биофармацевтической отрасли в Российской Федерации и программы импортозамещения.

7. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

1. **Тимонова, С. С.** Принцип оперативного выбора лидерных клонов-продуцентов моноклональных антител при создании стабильных клеточных линий на основе СНО / С. С. Тимонова, В. И. Павелко, И. А. Кирик, В. Н. Бадэ, Т. О. Малыгина, Р. А. Хамитов, А. А. Пискунов // Биотехнология. – 2019. – Том 35. – № 4. – С. 65–72. doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-65-72.

2. **Тимонова, С. С.** Оптимизация процесса культивирования клона-продуцента рекомбинантного лизосомального фермента идуронат-2-сульфатазы / С. С. Тимонова, М. С. Пантюшенко, Р. В. Тихонов, А. А. Пискунов, В. Н. Бадэ // Биотехнология. – 2021. – Том 37. – № 2. – С. 34–47. doi: 10.21519/0234-2758-2021-37-2-34-47.

3. **Тимонова, С. С.** Увеличение продуктивности клеточной линии-продуцента арилсульфатазы В за счет коэкспрессии формилглицин генерирующего фермента / С. С. Тимонова, К. А. Смолова, Д. Т. Зарипова, М. С. Пантюшенко, М. А. Королева, Р. Л. Анисимов, Р. А. Хамитов, А. А. Пискунов, В. Н. Бадэ // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2022. Том 22. – № 1. – С. 80–93. doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-80-93.

Патенты:

1. Патент на изобретение RU2020107533А Российская Федерация: Клетка, продуцирующая с высокой эффективностью активный белок арилсульфатазу В, и способ получения этой клетки / Пискунов А. А., Бадэ В. Н., **Тимонова С. С.** Патентообладатель АО "Генериум". заявл. 19.02.2020; опубл. 19.08.2021, Бюл. №23 – 1 с.

Выступления на конференциях:

1. Научно-техническая конференция международного биотехнологического центра «Генериум» в 2018г, на тему «Создание клонов-продуцентов рекомбинантного фермента идуронат-2-сульфатазы для терапии мукополисахаридоза II типа (синдром Хантера)».

2. Научно-техническая конференция международного биотехнологического центра «Генериум» в 2021г, на тему «Разработка моноклональной клеточной линии сложноэкспрессируемого лизосомального фермента арилсульфатазы В за счет коэкспрессии вспомогательного формилглицин генерирующего фермента».

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

4-MU	– 4-метилумбеллиферон
AMBR (ambr®15)	– роботизированная система миниореакторов Ambr Tap Biosystems
ARSB	– ген, кодирующий арилсульфатазу В
ASB	– рекомбинантный лизосомальный фермент арилсульфатаза В, Arylsulfatase B; N-acetylgalactosamine-4-sulfatase, EC3.1.6.12
ASB+FGE	– клон-продуцент, коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE, культивируемый на среде BCD
ASB+FGE+Ca	– клон-продуцент, коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE, культивируемый на среде BCD с добавлением хлорида кальция;
ASB+FGE+Cu+C a	– клон-продуцент, коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди и хлорида кальция
ASB+FGE+Cu	– клон-продуцент, коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди;
ASB-Cu	– клон-продуцент ASB, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди;
ASB-Cu+Ca	– клон-продуцент ASB, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди и хлорида кальция
ASB-control	– клон-продуцент ASB, культивируемый на среде BCD
BCD	– среда для культивирования BalanCD Growth A
Batch	– периодическое культивирование клеток
CCD	– кумулятивная клеточная плотность
CHO	– клетки яичника китайского хомячка, адаптированные к суспензионному культивированию
DO	– растворенный кислород в культуральной среде (Dissolved oxygen)
FGE	– FGly-генерирующий фермент; C- α -формилглицин генерирующий фермент
Fed-batch	– периодическое культивирование клеток с подпиткой
I2S	– фермент идуронат-2-сульфатаза, идурсульфаза
IDS	– ген, кодирующий лизосомальный фермент идуронат-2-сульфатазу
LSD	– лизосомная болезнь накопления
PBS	– фосфатно-буферный раствор
PBS-T	– фосфатно-буферный раствор с добавлением твина
PBS-Ta	– фосфатно-буферный раствор с добавлением твина и бычьего сывороточного альбумина
Qp	– специфическая продуктивность, пг/клетка/сут
SUMF1	– ген, кодирующий FGly-генерирующий фермент
VCD	– плотность жизнеспособных клеток, 10 ⁶ клеток/мл
ГАГ	– гликозамингликаны, мукополисахара

ГИК	– генно-инженерная конструкция (плазмида)
ИФА	– иммуноферментный анализ
КЖ	– культуральная жидкость
МПС	– мукополисахаридоз
OD	- оптическая плотность
ССD	– кумулятивная клеточная плотность
ФЗТ	– ферментная заместительная терапия