

Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ»

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Пискунов Александр Александрович

Вольгинский-2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	12
1.1 Типы мукополисахаридоза.....	12
1.1.1 Мукополисахаридоз II и VI типов.....	13
1.2 Способы лечения при мукополисахаридозе.....	14
1.2.1 Ферментная заместительная терапия.....	14
1.2.2 Другие методы лечения при мукополисахаридозе.....	16
1.3 Активный сайт ферментов подкласса сульфатаз.....	18
1.3.1 Функция маннозо–6–фосфатных остатков у лизосомальных ферментов подкласса сульфатаз	21
1.4 Клеточные линии-продуценты, используемые для производства рекомбинантных белков	23
1.4.1 Прокариотические бактериальные клеточные линии-продуценты.....	24
1.4.2 Дрожжевые клеточные линии-продуценты	25
1.4.3 Клеточные линии-продуценты на основе растений	25
1.4.4 Клеточные линии человека	26
1.4.5 Клеточные линии-продуценты на основе насекомых.....	27
1.4.6 Клеточные линии-продуценты на основе млекопитающих	27
1.5 Разработка стабильных моноклональных клеточных линий-продуцентов рекомбинантных белков на основе клеточной линии CHO	31
1.5.1 Создание минипулов–продуцентов рекомбинантных белков.....	33
на основе клеточной линии CHO	33
1.5.2 Получение моноклональных клеточных линий-продуцентов рекомбинантных белков на основе клеточной линии CHO	35
1.5.3 Исследование стабильности ростовых и продукционных характеристик клонов–продуцентов.....	40
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	41
ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
2.1 Материалы	41

2.1.1 Клеточные культуры.....	41
2.1.2 Основные реактивы, растворы и питательные среды.....	41
2.1.3 Оборудование, использованное в работе	42
2.2 Методы	44
2.2.1 Молекулярные методы	44
2.2.2. Методы работы с клеточными культурами.....	46
2.2.3 Биохимические, физико-химические и иммунохимические методы	51
2.2.4 Статистические методы обработки результатов исследований.....	55
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ И ТЕХНОЛОГИИ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДЛЯ ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО АКТИВНОГО ФЕРМЕНТА ИДУРОНАТ-2-СУЛЬФАТАЗЫ.....	56
3.1 Трансфекция клеток СНО плазмидой, содержащей ген IDS	56
3.2 Получение минипулов–продуцентов идуронат–2–сульфатазы.....	57
3.3 Получение клонов–продуцентов идуронат–2–сульфатазы.....	60
3.4 Оптимизация состава ростовой среды для культивирования клона с целью увеличения удельной активности идуронат–2–сульфатазы.....	63
3.5 Оптимизация процесса культивирования клона-продуцента идуронат–2–сульфатазы с целью подбора оптимального компонента для фидирования ...	65
3.6 Подбор температурного режима и оптимизация добавления подкормки клона в условиях периодического культивирования	68
Заключение по главе 3.....	73
ГЛАВА 4. ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА АРИЛСУЛЬФАТАЗЫ В.....	74
4.1 Трансфекция клеток СНО плазмидой, содержащей ген ARSB	74
4.2 Получение минипулов–продуцентов рекомбинантного лизосомального фермента арилсульфатазы В.....	75
4.3 Получение клонов-продуцентов рекомбинантного лизосомального фермента арилсульфатазы В.....	78

4.4 Изучение влияния добавления сульфата меди и хлорида кальция на продуктивность, ростовые характеристики и метаболизм клона-продуцента рекомбинантного лизосомального фермента арилсульфатазы В	79
4.5 Увеличение продуктивности клона-продуцента арилсульфатазы В за счет коэкспрессии вспомогательного формилглицин генерирующего фермента ...	81
Заключение по главе 4.....	84
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ, КОЭКСПРЕССИРУЮЩИХ АРИЛСУЛЬФАТАЗУ В И ФОРМИЛГЛИЦИН ГЕНЕРИРУЮЩИЙ ФЕРМЕНТЫ И ТЕХНОЛОГИИ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДЛЯ ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО АКТИВНОГО ФЕРМЕНТА АРИСУЛЬФАТАЗЫ В.....	85
5.1 Котрансфекция клеток СНО плазмидами с генами ARSB и SUMF1	85
5.2 Получение минипулов–продуцентов коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин генерирующий фермент	86
5.3 Получение клонов–продуцентов коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин генерирующий фермент	90
5.4 Изучение влияния хлорида кальция и сульфата меди на ростовые и продукционные характеристики клонов-продуцентов коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин генерирующий фермент.....	95
5.5 Оптимизация условий культивирования лидерного	97
Заклучение по главе 5.....	102
ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ЭКСПРЕССИОННЫХ И РОСТОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК КЛОНОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ИДУРОНАТ-2-СУЛЬФАТАЗЫ И АРИЛСУЛЬФАТАЗЫ В.....	104
Заклучение по главе 6.....	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	111
ВЫВОДЫ	113
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	115
СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ.....	118

ПРИЛОЖЕНИЯ.....	119
Свидетельство о выдаче патента: «Клетка, продуцирующая с высокой эффективностью активный белок арилсульфатазу В, и способ получения этой клетки».....	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120
БЛАГОДАРНОСТЬ.....	140

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

Мукополисахаридоз (МПС) – группа орфанных генетических заболеваний [1], обусловленных отсутствием или неправильным функционированием лизосомальных ферментов, необходимых для расщепления гликозаминогликанов (ГАГ, мукополисахаридов) [2].

МПС II типа передается по рецессивному X-сцепленному типу наследования. Вследствие мутации гена IDS происходит ферментная недостаточность лизосомального фермента идуронат-2-сульфатазы (IDS) [3]. Дисфункция данного фермента приводит к накоплению гепарансульфата и дерматансульфата (Таблица 1) во всех тканях и органах [4]. МПС II является наиболее распространённой формой среди всех видов МПС [5]. Заболевание проявляется задержкой роста, выраженными деформациями костей и суставов и т. д. (Рисунок 1) [6].

Таблица 1 – Мукополисахаридоз II и VI типов

Тип	Название	Ген	Недостающий фермент	Гликозамингликаны
МПС II	Синдром Хантера	IDS	идуронат-2-сульфатаза	Гепарансульфат Дерматансульфат
МПС VI	Синдром Маротто-Лами	ARSB	арилсульфатаза B	Дерматансульфат

МПС VI типа передается по аутосомно-рецессивному типу наследования, и вызван нарушением функции фермента арилсульфатазы B (ASB) [7]. Дисфункция гена ARSB проявляется в накоплении преимущественно дерматансульфата (Таблица 1) в лизосоме, что постепенно приводит к задержке роста [8], выраженным скелетным деформациям, лицевым дисморфиям, патологиям сердечно-сосудистой системы и когнитивным нарушениям [9] (Рисунок 1) и т. п.

Стандартное лечение МПС VI типа, утверждённое Минздравом Российской Федерации (РФ), предусматривает использование ферментной заместительной

терапии импортным препаратом «Наглазим» (Naglazyme[®], BioMarin, США) [10–12], а для МПС II типа, препаратом «Элапраза» (Elaprase[®], Shire, США) [13–16].

Ферменты ASB и I2S относятся к подклассу сульфатаз, поэтому принципы и подходы в разработки клеточных линий-продуцентов будут схожи [17].



Рисунок 1. Фотографии детей, страдающих МПС II и VI типов соответственно

Таблица 2 – Число больных МПС II и VI типов. Данные 2021 года.

Тип	Название	Встречаемость	Больных в РФ	Больных в развитых странах	Затраты в год на больных в РФ, 2021 год, руб.
МПС II	Синдром Хантера	1:100 000 мальчиков	110	~ 3324	3,1 млрд рублей
МПС VI	Синдром Маротто–Лами	1:250 000	56	~ 1100	1,2 млрд рублей

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

1. Получить опыт в создании отечественных биофармацевтических препаратов;
2. Получить высокотехнологичные отечественные биопрепараты арилсульфатазы В и идуронат–2–сульфатазы на основе клеточной линии млекопитающих СНО без использования белков животного происхождения;
3. Обеспечить пациентов доступными препаратами;
4. Существенно снизить нагрузку на федеральный бюджет, который закупает импортные препараты «Наглазим» и «Элапраза» для больных МПС II, VI (Таблица. 2).

Степень разработанности темы исследования.

Создание биофармацевтических препаратов требует уникального дорогостоящего оборудования и нестандартных подходов в решении проблем. 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 ГИК клеток линии Chinese Hamster Ovary (CHO); получение моноклональных клеточных линий; проведение поиска лидерных клонов-продуцентов; разработка технологии культивирования продуцентов; изучение показателей роста и продуктивности клонов; изучение стабильности роста и продуктивности полученных клонов; изучение ряда показателей физико-химических свойств целевых белков.

Цели 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 CHO генно-инженерными конструкциями, кодирующими гены ферментов;
2. Провести ряд скринингов для отбора лидерных клонов–продуцентов по ростовым характеристикам и продуктивности;
3. Изучить ростовые и производственные характеристики лидерных клонов–продуцентов;
4. Изучить производственную и ростовую стабильность полученных клеточных линий;
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 культивируют 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 против МПС II и VI типов:

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

Методология и методы исследования.

Объектом исследования является разработка технологии получения клеточных линий-продуценты 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.

Личный вклад соискателя.

Автором были получены линии-продуценты, включая финальные стабильные моноклональные клеточные линии–продуценты рекомбинантных лизосомальных ферментов ASB и I2S на основе СНО; проведена оптимизация культивирования клонов–продуцентов ASB и I2S; создан исследовательский банк продуцентов; проведены исследования влияния коэкспрессии вспомогательного формилглицин-генерирующего фермента на продукцию алирсульфатазы В,

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

Степень достоверности и апробации результатов диссертации.

Основные результаты исследований представлены на научно-практических конференциях АО «Генериум» в июне 2018 г. и 2021 г.

Разработка продуцентов выполнена в 2016–2021 гг. на базе научно-производственной площадки АО «Генериум» в отделе клеточной биологии (ОКБ). Создание экспрессионных векторов проведено в лаборатории молекулярной биологии и биохимии, выделение и очистка белка осуществлены в отделе разработки процесса (ОРП), физико-химические исследования выполнены в отделе аналитических методов (ОАМ).

Основные 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 с 1 л культуральной жидкости (КЖ).
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, с добавлением в ростовую среду сульфата меди.

Структура и объем диссертации.

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

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Типы мукополисахаридоза

МПС представляет собой группу из 11 типов орфанных генетических заболеваний (Таблица 3). Каждый тип МПС характеризуется дефицитом лизосомального фермента, дисфункция которого влияет на один из этапов деградации ГАГ в клетке (Таблица 3). Это приводит к постепенному накоплению нерасщепленных продуктов метаболизма в тканях и органах. Все виды МПС наследуются по аутосомно–рецессивному типу, кроме МПС II. МПС II наследуется по X–сцепленному рецессивному типу [18; 19], поэтому принято считать, что МПС II чаще проявляется у лиц мужского пола. Тем не менее, известны случаи, когда МПС II наблюдали у женщин, гетерозиготных по гену IDS, где доминантная аллель данного гена не экспрессировалась нормально из–за повреждений в процессе инактивации X–хромосомы [20–22].

Таблица 3 – Типы мукополисахаридоза

Типы МПС	Название синдрома	Дефектный фермент	Ген	Встречаемость	
I	Гурлер Гурлер — Шейе Шейе	α -идуронидаза	IDUA	1:100 000	
II	Хантер	идуронат–2–сульфатаза	IDS	1:100 000–1:150 000 (мальчики)	
III	Санфилиппо	A	гепаран–N–сульфатаза	SGSH	1:280 000– 1:50 000
		B	α -N–ацетилглюкозаминидаза	NAGLU	
		C	глюкозамин N–ацетилтрансфераза	HGSNA T	
		D	N–ацетилглюкозамин 6–сульфатаза	GNS	
IV	Моркио	A	галактозамин–6–сульфат сульфатаза	GALNS	1:75 000
		B	β -Галактозидаза	GLB1	
VI	Марото–Лами	N–ацетилгалактозамин 4–сульфатаза	ARSB	1:250 000	
VII	Слая	β -глюкуронидаза	GUSB	<1:250 000	
IX	Натовича	гиалуронидаза 1	HYAL1	*	

Примечание к таблице 3:

* Синдром Натовича – самая редкая форма МПС, на 2016 год было зарегистрировано всего 4 пациента с данным заболеванием. Эта форма МПС была впервые описана в 1996 году [23].

- МПС V – прежнее обозначение синдрома Шейе. Однако, когда было обнаружено, что и синдром Гурлера, и синдром Шейе возникают из-за дефицита одного и того же фермента, синдром Шейе был переклассифицирован как подтип МПС I; чтобы избежать путаницы, МПС V не использовали.

- МПС VIII – Синдром ДиФерранте – устаревший термин для обозначения формы МПС, описанной у одного человека, с клиническими и биохимическими особенностями синдромов Моркио и Санфилиппо. Позже доктор Ди Ферранте обнаружил, что у его пациента уровень фермента был нормальным, и заболевание было неправильно диагностировано. Чтобы избежать ошибок, МПС VIII больше не использовали.

1.1.1 Мукополисахаридоз II и VI типов

Патогенетический механизм МПС II и VI связан с накоплением дерматан– и гепарансульфатов в организме [24]. Расщепление дерматан– и гепарансульфатов в лизосомах происходит за счет гидролитического отщепления сульфатных групп лизосомальными ферментами I2S и ASB (Рисунок 2) [25; 26].

МПС II является наиболее распространённой формой среди МПС. Заболевание проявляется выраженными деформациями костей и суставов. Встречаются случаи, когда дисфункция гена IDS приводит к серьезным нарушениям нервной системы, связанным с интеллектуальной деятельностью [27]. Вследствие мутации гена IDS происходит ферментная недостаточность лизосомальной идуронат–2–сульфатазы (I2S) [18]. Способ лечения МПС II типа, предусматривает использование ферментной заместительной терапии препаратом «Элапраза» (Elaprase ®, Shire, США) [28; 29], являющимся рекомбинантным аналогом I2S.

МПС VI вызван отсутствием или неправильным функционированием лизосомального фермента N–ацетилгалактозамин–4–сульфата (арилсульфатаза B, ASB), в результате чего не происходит расщепления дерматансульфата в лизосоме [30; 31]. Один из способов лечения МПС VI типа предусматривает использование ферментной заместительной терапии препаратом «Наглазим» (BioMarin, США) [32; 33]. Заболевание также проявляется грубыми чертами лица, задержкой роста,

выраженными деформациями костей и суставов, проблемами с нервной системой [27] и т. д. Препарат используется для лечения взрослых и детей с данным заболеванием [34–36]. Раннее диагностирование и своевременная ФЗТ позволяют существенно замедлить клинические симптомы, связанные с МПС VI [37].

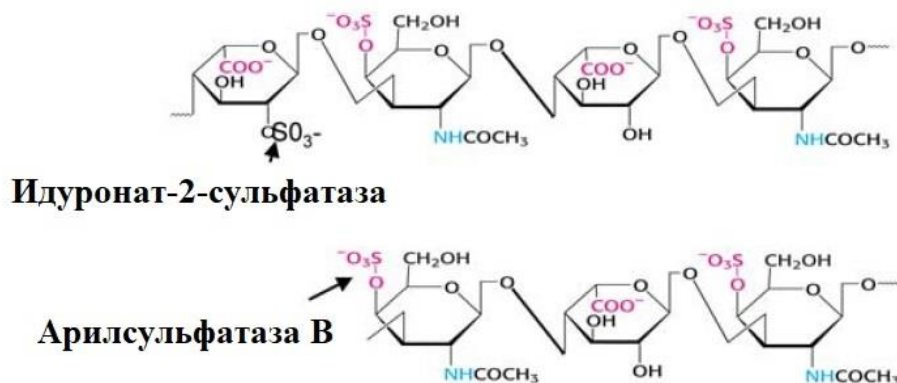


Рисунок 2. Схема последовательного расщепления дерматансульфата под действием лизосомальных ферментов I2S и ASB. Стрелками указаны связи, которые расщепляют сульфатазы.

1.2 Способы лечения при мукополисахаридозе

1.2.1 Ферментная заместительная терапия

Ферментная заместительная терапия (ФЗТ) для всех групп заболеваний лизосомальных накоплений основана на способности клеток повторно захватывать лизосомальные гидролазы [38; 39]. ФЗТ применяют путем внутривенной инфузии в дозах, определяемых массой тела пациента, обычно каждые две недели в течение всей жизни [40].

Первые попытки ФЗТ были предприняты в 1973 году. Эксперименты проводили с гексозаминидазой А (Синдром Сандхоффа) [41]. Введенные ферменты поглощаются клетками и поступают в лизосомы, где они катаболизируют накопившиеся субстраты. ФЗТ может влиять на качество жизни и способность выполнять повседневную деятельность, когнитивное развитие и облегчение симптомов конкретного заболевания. С развитием молекулярной биологии, генетики и других наук, на 2020 год одобрены и успешно применяются 12 препаратов ФЗТ и около 40 проходят клинические испытания и/или являются «биоаналогами» существующих препаратов ФЗТ (Таблица 4). Раннее

диагностирование заболевания и своевременная ФЗТ позволяет существенно замедлить клинические симптомы, связанные с МПС [37].

К недостаткам ФЗТ можно отнести высокую стоимость препаратов, ограниченность биораспределения после внутривенных инфузий, т. к. фермент не доступен для определенных участков тела, таких как мозг, кости, легкие. Кроме того, эффективность ФЗТ снижается из-за иммунного ответа против введенного фермента [42; 43].

Таблица 4 – Препараты для ферментной заместительной терапии лизосомальных болезней накопления

Болезнь	Фермент	Препараты	Производитель	Год старта продаж
Болезнь Фабри	Агалсидаза бета [44]	Fabrazyme	Genzyme Europe Bv	2001
Болезнь Фабри	Агалсидаза альфа [45]	Replagal	Shire Human Genetic Therapies Ab	2001
Болезнь Гоше	Имиглюцераза [46]	Cerezyme	Genzyme Corporation	1994
Болезнь Гоше	Талиглюцераза альфа [47]	Elelyso	Pfizer Laboratories Div Pfizer Inc	2012
Болезнь Гоше	Велаглюцераза альфа [48]	Vpriv	Takeda Pharmaceuticals America, Inc.	2010
Болезнь Гоше I типа	Альглюцераза [49]	Ceredase	Genzyme Corporation	1991
Дефицит лизосомальной кислой липазы (болезнь Вольмана / CESD)	Себелипаза альфа [50]	Kanuma	Alexion Pharmaceuticals, Inc.	2015
МПС I	Ларонидаза [51]	Aldurazyme	Genzyme Corporation	2003
МПС II	Идурсульфаз [52]	Elaprase	Shire Human Genetic Ther API Es Inc	2007
МПС IVA	Элосульфаз альфа [53]	Vimizim	BioMarin Pharmaceutical Inc.	2014
МПС VI	Арилсульфатаза B [32]	Naglazyme	BioMarin Pharmaceutical Inc.	2005
Болезнь Помпе	Альглюкозидаза альфа [54]	Myozyme	Genzyme Europe Bv	2006

1.2.2 Другие методы лечения при мукополисахаридозе

Неспособность рекомбинантных ферментов при ФЗТ, преодолевать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [55], в то время как неврологическое поражение часто является критическим, приводит к поиску новых решений и эффективных терапевтических стратегий. Существуют иные подходы в лечении МПС, представленные ниже.

Субстрат-восстановительная терапия

Один из подходов в лечение МПС – терапия с уменьшением количества субстратов. За счет подавления синтеза субстрата его накопление в клетках может быть уменьшено. В настоящее время N-бутилдезоксиноджиримицин (Miglustat/МиглуSTAT, Zavesca, Oxford GlycoSciences) – единственная зарегистрированная терапия снижения субстрата при лизосомальных болезнях накопления. МиглуSTAT подавляет синтез глюкосфинголипидов и зарегистрирован для лечения болезней Гоше и Ниманна–Пика типа С [56]. Однако, известны случаи, когда данный препарат применяют для терапии больных МПС, из-за его способности проникать через ГЭБ [57; 58].

Генная терапия

В настоящее время существуют два основных подхода к генной терапии: генная терапия *in vivo*, при которой вирус, несущий терапевтический ген, вводится внутривенно или локально, при которой ген доставляется в соматические клетки пациентов; генная терапия *ex vivo*, при которой ген трансдуцируется в соматические клетки, полученные от пациента, а затем трансплантируется обратно реципиенту [59]. Для генной терапии *in vivo* гены в основном трансдуцируются использованием различных вирусных векторных систем, включая векторы на основе ретровирусных, лентивирусных, аденовирусных и аденоассоциированных вирусов (AAV). В настоящее время клинические испытания препаратов для генной

терапии I/II фазы некоторых типов МПС I¹, II^{2,3}, IIIA^{4,5} и VI⁶ проводятся в США, и странах Европы и в Австралии.

Шаперонная терапия

Шаперонная терапия – это новый молекулярный терапевтический подход в первую очередь для лечения лизосомных заболеваний. Неправильные посттрансляционные модификации (ПТМ) дефектных ферментов могут приводить к их преждевременной деградации и агрегации, в результате чего не происходит расщепления субстратов. Шаперонная терапия основана на способности шаперонов связываться с ортостерическими/аллостерическими сайтами дефектного фермента и повышать вероятность функциональной ПТМ мутантного белка, предотвращая агрегацию/деградацию фермента [60; 61]. Преимуществом шаперонной терапии является пероральный прием лекарств и восстановление метаболического процесса за счет повышения активности дефектных ферментов [62; 63].

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) может быть аутогенной (с использованием собственных клеток пациента) или аллогенной (с использованием клеток от донора). Забор ГСК проводится из костного мозга, периферической крови или пуповинной крови. ГСК трансдуцируют *ex vivo* с помощью гаммаретровирусов или лентивирусных векторов для трансдукции генов лизосомального фермента в клетки реципиента. После чего клетки трансплантируются в тело реципиента с использованием стандартных процедур, разработанных для трансплантации костного мозга.

В настоящее время известно много случаев, когда после трансплантации ГСК значительно улучшаются когнитивные функции больных МПС [64; 65].

¹ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02702115>

² <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03041324>

³ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03566043>

⁴ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01474343>

⁵ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02053064>

⁶ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03173521>

В настоящее время проводится широкий ряд клинических исследований по трансплантации ГСК для МПС⁷.

1.3 Активный сайт ферментов подкласса сульфатаз

Ферменты ASB и I2S относятся к подклассу ферментов сульфатаз. Сульфатазы (EC 3.1.6) относят к классу гидролаз, которые катализируют гидролиз сульфатов [66–68], сульфолипидов и стероидсульфатов, в эукариотических клетках, участвуют в деградации сульфатированных ГАГ и гликолипидов в лизосоме [69]. Таким образом, сульфатазы играют ключевую роль в клеточной деградации, гормональной регуляции, а также в ремоделировании сульфатированных ГАГ в межклеточной жидкости [70].

Для ферментативной активности большинства сульфатаз необходима посттрансляционная модификация превращения остатка серина (Ser) или цистеина (Cys) [71; 72], в активном центре сульфатазы в молекулу С- α -формилглицина (fGly) [73; 74]. Именно с помощью остатка fGly в активном центре сульфатазы происходит гидролиз ГАГ: молекула воды вступает в реакцию с формильной группой образуя гидрат альдегида (Рисунок 3–А, (1)), затем происходит нуклеофильная атака сульфатного эфира ГАГ (субстрата) одной из гидроксильных групп гидрата альдегида, что приводит к переэтерификации (Рисунок 3–А (2)) сульфатной группы субстрата на фермент (сульфатазу), в результате чего образуется сульфатированный fGly и промежуточный продукт (Product–ОН). Затем происходит восстановление сульфатированного fGly и регенерация альдегида (Рисунок 3–А, (3)).

Большинство fGly–содержащих сульфатаз обладают общей пентапептидной последовательностью (Cys/Ser)–Xxx–(Pro/Ala)–Xxx–Arg в активном центре фермента, которая обуславливает посттрансляционную модификацию первого остатка Cys (как у эукариот, так и у прокариот) или серина (у прокариот) на fGly (Рисунок 3–В) [75; 76].

⁷https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Hematopoietic+Stem+Cell+Transplant&cond=mucopolysaccharidosis&age_v=&gndr=&type=Intr&rslt=&Search=%D0%9F%D1%80%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D1%82%D1%8C+

Образование остатка fGly в активном сайте сульфатазы во время биосинтеза фермента катализируется вспомогательным формилглицин–генерирующим ферментом (EC 1.8.3.7, Formylglycine–generating enzyme, FGE) (Рисунок 3–В) [77–79]. FGE локализуется в эндоплазматическом ретикулуме, где взаимодействует с развернутой вторичной структурой сульфатаз и модифицирует ее активный центр до fGly [80]. Ген SUMF1 кодирует нуклеотидную последовательность вспомогательного белка FGE [68].

Изучение молекулярной структуры человеческого FGE и различных окисленных форм показывают, что активный центр молекулы FGE содержит два остатка Cys₃₃₆ и Cys₃₄₁, с помощью которых происходит посттрансляционная модификация сульфатазы [81].

Существует несколько предложенных механизмов реакции, с помощью которых происходит конверсия Cys в fGly под действием FGE:

В первом варианте вспомогательный фермент FGE использует молекулярный кислород для модификации Cys. Белки семейства FGE по данной теории являются кофактор–независимыми аэробными ферментами. Один из механизмов модификации Cys в fGly, происходит в результате образования смешанного дисульфида между активным центром молекулы сульфатазы и активным центром FGE в положении Cys₃₄₁ (Рисунок 3–С). Существуют также другие предложенные варианты механизма реакции с использованием молекулярного кислорода [82].

Во втором варианте FGE представляет собой кофермент, который связывает медь стехиометрически (Рисунок 3–D) и использует молекулярный кислород, что приводит к ферментативному каскаду реакций. Кофактором к ферменту FGE являются ионы меди [83–85].

Исходя из литературных данных, представленных выше, в данной работе для улучшения характеристик получаемых клеточных линий–продуцентов рекомбинантных лизосомальных ферментов–сульфатаз ASB и I2S использовали добавку сульфата меди в качестве источника ионов меди.

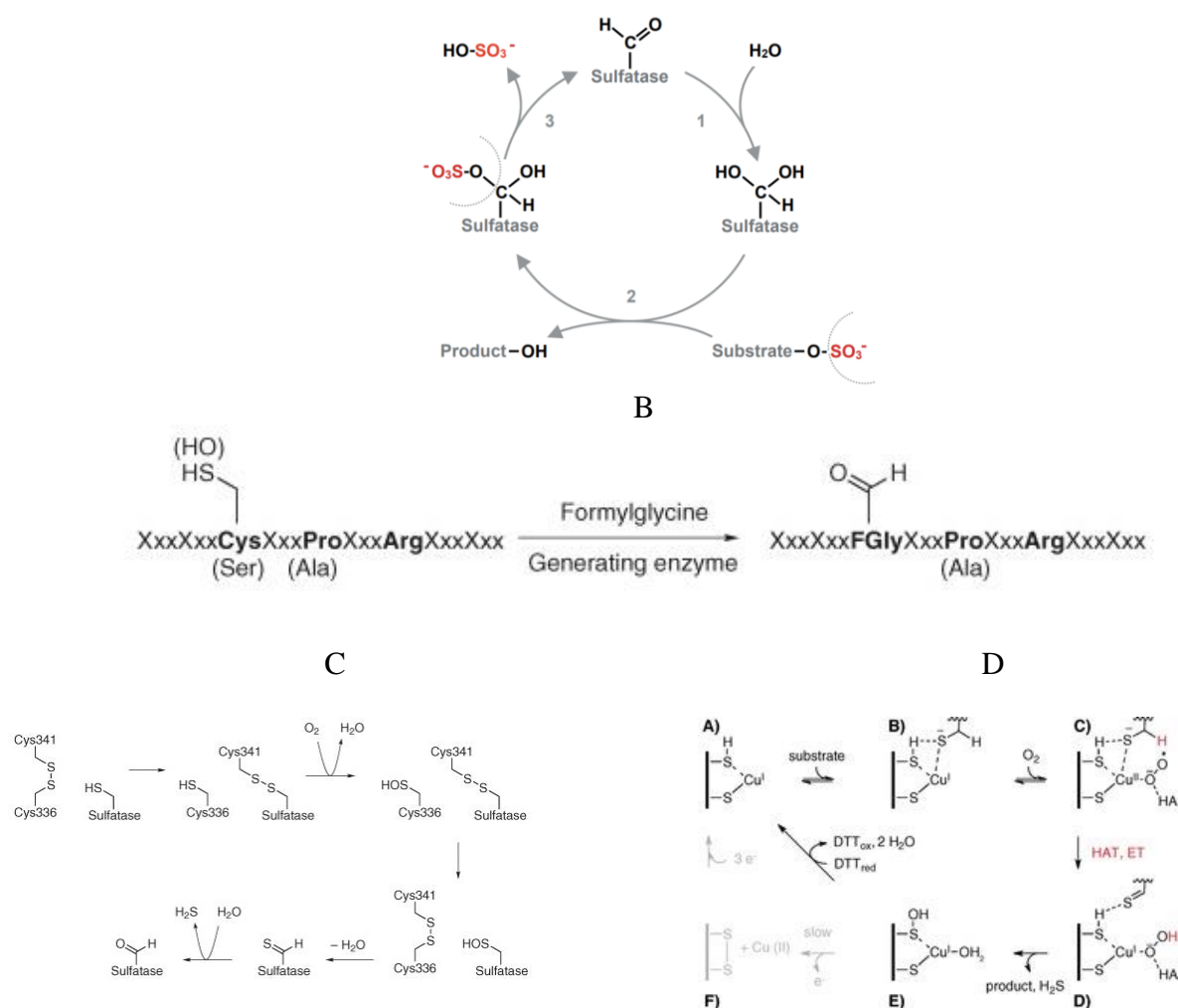


Рисунок 3. А – Гидролиз сульфатных эфиров с помощью активного центра fGly в молекулах сульфатаз. В – Пентапептидная последовательность (C/S)X(P/A)XR в активном центре сульфатаз. Трансформация Cys в fGly под действием FGE [86]. С – Схема реакции посттрансляционного преобразования Cys в активном центре сульфатазы до молекулы C- α -формилглицин посредством вспомогательного белка FGE и молекулярного кислорода [86]. D – Схема реакции посттрансляционного преобразования Cys в активном центре сульфатазы до молекулы C- α -формилглицин посредством вспомогательного белка FGE и молекулярного кислорода, с участием медного ко-фактора [84]: А – фермент FGE, субстрат-сульфатаза, В – связь фермента FGE и сульфатазы в активных центрах молекул, С – образование оксо-промежуточного комплекса под действие молекулярного кислорода, D – перенос атомов водорода (HAT) и перенос электронов (ET) от сульфатазы и восстановление оксо-промежуточного комплекса до Cu^I, E – гидролиз тиоальдегида с образованием fGly-содержащей сульфатазы и сероводорода, F – восстановление фермента FGE [85].

1.3.1 Функция маннозо–6–фосфатных остатков у лизосомальных ферментов подкласса сульфатаз

После того, как сульфатаза была активирована (Cys-fGly), свернута и N-гликозилирована в эндоплазматическом ретикулуме, она транспортируется в аппарат Гольджи, где происходят дополнительные ПТМ (Рисунок 4) [87].

Лизосомальные ферменты распознаются среди многих других белков, во время биосинтеза, благодаря, уникальным маркерам: группой маннозо–6–фосфатных остатков (М6Р), которая добавляется исключительно к N-связанным олигосахаридам лизосомальных растворимых гидролаз [88].

За присоединение М6Р-остатков в комплексе Гольджи отвечают два белка: N-ацетилглюкозамин–1–фосфотрансфераза (GlcNAc фосфотрансфераза, EC 2.7.8.17, GNPTAB⁸) и α -N-ацетилглюкозамин–1–фосфодиэфирная α -N-ацетилглюкозаминидаза (фосфодиэстераза, EC 3.1.4.45, NAGPA⁹) [88].

В цис-Гольджи, GlcNAc фосфотрансфераза отвечает за добавление GlcNAc–1–фосфатного–остатка к гидролазе. При этом образуется фосфодиэфир Man–phosphate–GlcNAc. После образования фосфодиэфира, лизосомальный фермент перемещается в транс-Гольджи, где фосфодиэстераза удаляет остаток GlcNAc, открывая М6Р остаток [89].

Затем остатки М6Р распознаются двумя независимыми трансмембранными рецепторами М6Р, присутствующими в сети транс-Гольджи: катион–независимым (CD–MPR) и катион–зависимым (CI–MPR) рецептором М6Р [90]. Диссоциация лизосомальных гидролаз от CD–MPR и CI–MPR происходит за счет низкого значения рН в эндосоме/лизосоме, что позволяет циркулировать транспортным везикулам между сетью транс-Гольджи и эндосомами [91]. С помощью остатков М6Р происходит доставка лизосомальных гидролаз к эндосомам, которые в итоге развиваются в зрелые лизосомы [92]. Рецепторы CD–MPR и CI–MPR связывают лиганды наиболее эффективно при рН 6–7, таким образом позволяя рецепторам

⁸ <https://www.uniprot.org/uniprot/Q3T906>

⁹ <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9UK23>

связываться с лизосомальными ферментами в транс-Гольджи и высвобождать их в подкисленной среде эндосомы при pH 4–5 [93].

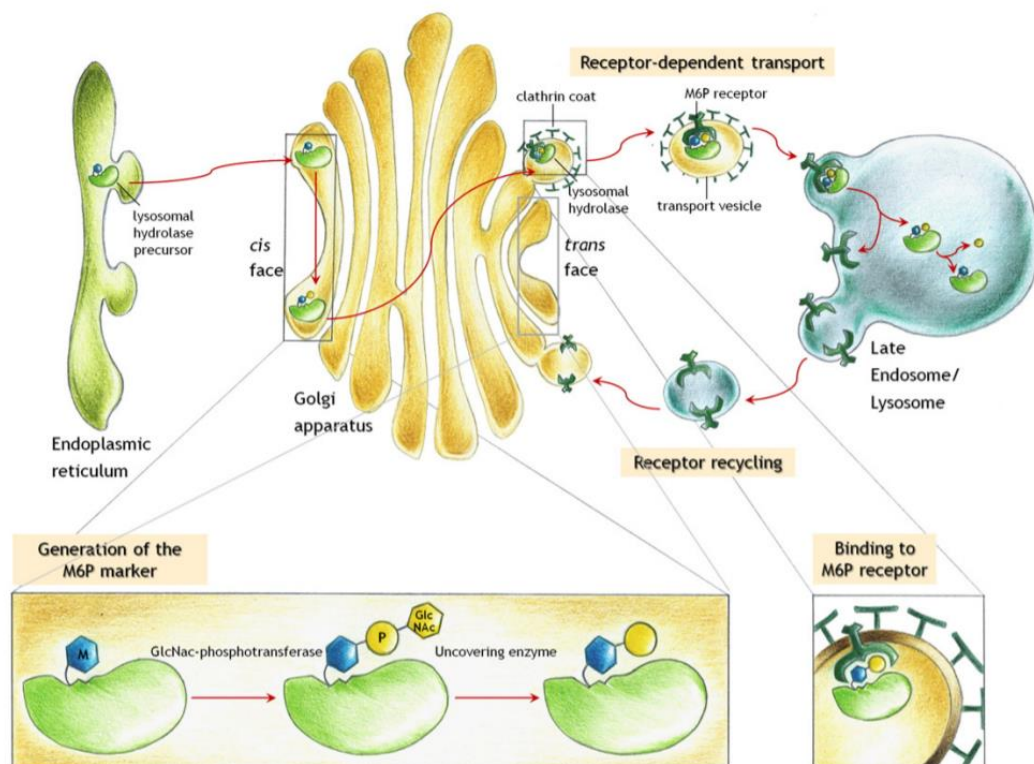


Рисунок 4. Схема М6Р–зависимого пути лизосомальных гидролаз.

Рецепторы CD-MPR и CI-MPR также присутствуют в клеточной мембране, их функция заключается в улавливании любых ферментов, меченных М6Р остатками, за счет чего происходит интернализация рекомбинантного фермента внутрь клетки [94; 95]. На этой способности основана ФЗТ для лизосомальных гидролаз, в частности и для сульфатаз I2S и ASB.

1.4 Клеточные линии-продуценты, используемые для производства рекомбинантных белков

Биотехнологические рекомбинантные продукты все чаще применяются в последнее время для терапии различных заболеваний. В связи с этим, биофармацевтическая промышленность заинтересована в решении различных задач, возникающих при разработке новых препаратов. Выбор клеточной экспрессионной платформы является основным звеном в получении высококачественного эффективного препарата [96–98]. Крупномасштабное коммерческое производство требует определенных характеристик клеточных линии, таких как масштабируемость, высокая продуктивность, способность расти в недорогих средах без сыворотки и соответствие требованиям чистоты и безопасности.

В настоящее время современные методы молекулярной биологии, генетики и клеточной биологии позволяют получать модифицированные клеточные линии различного происхождения с заданными определенными признаками за счет применения технологии РНК-интерференции и технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 [99–101]. В частности, были успешно созданы новые гликоинженерные клеточные линии, позволяющие производить гликопротеины, лишенные специфичных для растений и насекомых гликоэпитопов [102; 103]. Следующим этапом разработки будет использование инструментов биоинформатики и технологий редактирования генома для определения ключевых генов, ответственных за интересующие признаки.

В качестве экспрессионных систем рекомбинантных белков в биофармацевтике используют различные клеточные линии-продуценты не млекопитающих (бактерии, дрожжи, растения и насекомые) и клеточные линии-продуценты млекопитающих, включая человеческие линии клеток для производства биотерапевтических рекомбинантных белков. В таблице 5 представлены коммерчески доступные рекомбинантные ферменты и их клеточные линии-продуценты.

Таблица 5 – Клеточные линии-продуценты, используемые для получения различных терапевтических ферментов.

Происхождение	Клеточная линия	Рекомбинантные ферменты
Растения	Carrot cells	Талиглюцераза альфа
Бактерии	Escherichia coli	Аспарагиназа
		Глюкарпидаза
		Пеглотиказа
		Коллагеназа
		Метрелептин
Дрожжи	Saccharomyces cerevisiae	Окриплазмин
Линии клеток млекопитающих (не человека)	СНО	Агалсидаза бета
		Альглюкозидаза альфа
		Альтеплаза
		Элосульфаза альфа
		GalNAc 4-сульфатаза
		ДНКаза человека
		Гиалуронидаза
		Имиглюцераза
		Ларонидаза
		Тенектеплаза
Линии клеток человека	ХТ-1080	Агалсидаза альфа
		Идурсульфаза
		Велаглюцераза альфа

1.4.1 Прокариотические бактериальные клеточные линии-продуценты

Бактериальные линии-продуценты (например, *Escherichia coli*) обладают следующими преимуществами: простота культивирования и быстрый рост клеток. Однако бактериальные клеточные линии не способны осуществить сложное гликозилирование, из-за отсутствия определенных шаперонных белков и внутриклеточной компартментализации [104]. Кроме того, рекомбинантные белки человека скорее всего будут подвержены агрегации, образуя тельца включения, из-за низкой растворимости белков млекопитающих в прокаротических клетках. Поэтому бактериальные системы в основном используют для производства,

негликозилированных белков и/или гликопротеинов низкой молекулярной массы [105].

1.4.2 Дрожжевые клеточные линии-продуценты

Дрожжевые клеточные линии (например, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*) также обладают способностью к быстрому росту клеточной массы и высокому выходу продукта. Линии клеток дрожжей можно использовать для получения продукта, который нельзя получить из *E. coli* из-за проблем, связанных с фолдингом и стереохимией белка. Однако, экспрессия терапевтических гликопротеинов с профилем гликозилирования подобным человеком также затрудняется в данных клеточных линиях, в связи с высоким содержанием маннозы экспрессируемых белков, что является риском иммуногенности и меньшей эффективности терапевтического продукта в дальнейшем [106].

1.4.3 Клеточные линии-продуценты на основе растений

Первым одобренным препаратом, полученным на основе генетически модифицированной клеточной линии корня моркови, стал фермент талиглуцераза альфа для ФЗТ болезни Гоше 1 типа. Клинические испытания продемонстрировали эффективность и безопасность данного препарата у взрослых и детей [107–109].

Наиболее широко используемой линией растительных клеток для получения рекомбинантного белка является линия, полученная из табака (*Nicotiana tabacum* cv. *Bright Yellow 2*, ВУ-2). К настоящему моменту известны работы, где с помощью ВУ-2 успешно синтезированы множество рекомбинантных белков, включая антитела, вакцины, ферменты, факторы роста и цитокины [102]. Также для производства рекомбинантных белков используют другие растительные суспензионные культуры, полученные из растений *Oriza sativa* и *Arabidopsis thaliana* [110].

Однако, существует ряд технологических проблем, которые ограничивают широкое коммерческое применение экспрессионных платформ на основе растительных клеток: низкая продуктивность, сложность масштабирования,

протеолитическая деградация, агрегация клеток и гетерогенность культуры, трудности с криоконсервацией и очисткой полученных белков, отсутствие в растительной клетке основных сайтов гликозилирования, сиаловых кислот, характерных для человека [102]. Кроме того, растительные клетки продуцируют α -1,3-фруктозу и β -1,2-ксилозу, которые потенциально могут быть иммуногенными для человека [111].

1.4.4 Клеточные линии человека

Самое большое преимущество использования человеческих клеточных линий, заключается в том, что эти клетки производят белки с полностью совместимыми для человека ПТМ, а также в простом способе адаптации к суспензионным условиям культивирования в бессывороточных средах. Отсутствие иммуногенных ПТМ потенциально прогнозирует высокий терапевтический эффект рекомбинантного терапевтического белка [112].

К недостатку человеческих клеточных линий относят небольшой клинический опыт использования рекомбинантных белков подобного происхождения и потенциальное заражение вирусами человека. В связи с чем, можно прогнозировать повышение производственных расходов на этапе контроля качества продукта полученного белка, включающие несколько этапов инактивации или удаления вирусов, таких как нанофильтрация и т.д., повышенный риск переноса чужеродных возбудителей из-за отсутствия видового барьера [113].

В исследовательских целях и производстве биотехнологических продуктов чаще всего используют клеточные линии, приведенные ниже. Так, линия клеток НЕК293, полученная из клеток эмбриональной почки человека в 1973 г, а также линия клеток НЕК 293Т, экспрессирующая мутантную версию Т-антигена SV40 [114], очень широко используются в биологических исследованиях при создании белков и получении рекомбинантных ретровирусов [115]. Линия клеток ХТ-1080, была получена из фибросаркомы мужчины, пациент не подвергался радио- или химиотерапии, что снижает вероятность внесения нежелательных мутаций в клеточной линии [116]. Линия клеток PER.C6 была получена из эмбриональных

клеток сетчатки глаза человека, трансформированных генами E1A и E1B аденовируса типа 5 (Ad5), и используется для получения векторов Ad5 с делецией E1, а также для производства вакцины против гриппа [117]. Линия клеток HuH-7 была получена из карциномы гепатоцитов печени мужчины и широко используется при исследованиях вируса гепатита С и вируса лихорадки денге [118].

1.4.5 Клеточные линии-продуценты на основе насекомых

Клеточные линии насекомых, также эффективно используют для получения рекомбинантных белков, вирусоподобных частиц и вакцин. Для этого используется бакуловирусная векторная система экспрессии (BEVS), действия которой основано на естественной способности бакуловирусов заражать только клетки насекомых [119; 120]. Клеточные линии насекомых обладают рядом производственных преимуществ: отсутствие потребности в CO₂, более низкая потребность в энергии благодаря инкубации при более низких температурах [121].

Клеточная линия насекомых BTI-Tn-5B1-4 (High Five) представляет собой суспензионную линию, которая была получена из клеток яичников гусеницы *Trichoplusia ni*. Линию используют для получения биологически активного мышинового Интерферона β (IFN β) [122], для производства рекомбинантной вакцины против вируса папилломы человека Cervarix[®] (GlaxoSmithKline Biologicals, Бельгия) [123].

Клеточная линия Sf21 получена из такни яичников гусеницы *Spodoptera frugiperda*. Линию Sf9, субклон линии Sf21, используют для производства рекомбинантной вакцины против гриппа Flublok[®] (Protein Sciences Corporation) [124]. Также известна суспензионная клеточная линия QB-Tn9-4s, которая была успешно адаптирована к бессывороточной ростовой среде [125].

1.4.6 Клеточные линии-продуценты на основе млекопитающих

Большинство лицензированных в настоящее время биотерапевтических продуктов производится в клеточных линиях млекопитающих, поскольку белки синтезируемые этими клеточными линиями имеют профиль гликозилирования

наиболее близкий к человеческому [126]. Клеточные линии млекопитающих используют для продукции моноклональных антител, гормонов, цитокинов, ферментов, факторов свертывания крови, фьюжен-белков, конъюгированных белков и т.д.

Клеточная линия NS0 – получена из мышинной миеломы. К настоящему моменту доступны коммерческие препараты на основе линии NS0, например, гуманизированное моноклональное антитело даклизумаб¹⁰ («Zenapax» Roche, Швейцария) и экулизумаб («Soliris», Alexion Pharma, Швейцария) [127]. Также широко используют и другие клеточные линии на основе клеток млекопитающих: клеточная линия ВНК-21 – клетки фибробластов, полученные из почки золотистого хомячка; клеточная линия sp2/0-Ag14 – клетки мышинной миеломы и многие другие.

Преимущества и недостатки использования клеточной линии СНО

Наиболее часто используемой в биофармацевтике является клеточная линия СНО, полученная из эпителиальной ткани яичника китайского хомячка [112]. СНО используют для производства > 70% одобренных в настоящее время рекомбинантных белков [128]. Из-за длительного периода использования данной клеточной линии (впервые полученная в 1957 году) существует огромная практика получения и регистрации препаратов на основе СНО, что потенциально может снизить общие сроки разработки лекарственного препарата [129; 130].

Для производства рекомбинантных терапевтических гликопротеинов клеточная линия СНО успешно применяется по ряду многочисленных преимуществ: клетки подходят для крупномасштабных промышленных суспензионных процессов культивирования за счет способности достигать высоких клеточных плотностей и обеспечивать наибольший выход белка [131–133]. Также, клетки СНО экспрессируют рекомбинантные белки с подобным человеку профилем гликозилирования, поэтому, с большей вероятностью, полученные белки будут совместимы и биологически активны в организме

¹⁰https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/zenapax-epar-scientific-discussion_en.pdf

человека [134]. Более того, культура клеток СНО невосприимчива к человеческим вирусам, что является огромным преимуществом с точки зрения безопасности препаратов [135]. В ходе исследований, проведенных в 1989 году, были протестированы 44 патогена человека (включая вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), гриппа, полиомиелита, герпеса и кори), и было обнаружено, что большинство из них не реплицируются в клетках СНО [136]. Пониженная восприимчивость к человеческим вирусам может быть объяснена тем фактом, что многие вирусные гены не экспрессируются в клетках СНО [137]. Кроме того, эта клеточная линия удобна при проведении процесса биосинтеза, поскольку она устойчива к изменениям рН, и не обладает высокой чувствительностью к уровням кислорода, давления или температуры. [138].

Способность СНО расти в химически определенных ростовых средах без добавления компонентов животного происхождения, например, телячьей сыворотки, представляет преимущество в биобезопасности получаемых терапевтических белков: снижается риск заражения вирусами и прионами; упрощается выделение белков за счет снижения белковых загрязнений. Бессывороточные среды с определенным химическим составом обеспечивают лучшую воспроизводимость экспериментов и качество продукции, по сравнению со средами, содержащими белки человеческого или животного происхождения [112].

К недостаткам линии СНО относится наличие в составе гликанов рекомбинантных белков галактоза-альфа-1,3-галактозы (α -gal) и N-гликолилнейраминовой кислоты (NGNA) [139], не присутствующие в организме человека и являющиеся сильными иммуногенами. Поэтому в ходе получения продуцентов на основе клеток СНО необходим дополнительный скрининг клеточных линий-продуцентов, чтобы исключить клеточные линии, способные синтезировать α -gal и NGNA гликаны [140].

Первой ауксотрофной клеточной линией стала линия СНО-DUK, которая не экспрессирует ген фермента дигидрофолатредуктазы (DHFR), участвующий во внутриклеточном метаболизме фолатов. Отсутствие активности DHFR

означает, что клетки становятся зависимыми от глицина, гипоксантина и тимидина для выживания. Данный подход позволил создать более эффективный процесс отбора клеточных линий. Впоследствии, клетки CHO-DUK подвергли мутагенезу с помощью гамма-излучения, чтобы получить клеточную линию CHO-DG44, в которой оба аллеля локуса DHFR были полностью элиминированы [137].

К настоящему моменту используют большое количество различных условно и стабильно модифицированных клеточных линий на основе CHO¹¹ (Таблица 6) [141; 142].

Таблица 6 – История получения основных клеточных линии на основе CHO условно и стабильно модифицированные.

Название клеточной линии	Период создания и использования	Модификации	Происхождение
CHO-ori	1956-1960-е	случайная иммортализация	Первичная культура ткани яичника китайского хомяка
CHO-Prominus	1957-1980 гг.	ауксотрофия по пролину	CHO-ori
CHO-K1	1968-настоящее время	ауксотрофия по пролину	CHO-Prominus
CHO-S	1974-настоящее время	ауксотрофия по пролину	CHO-ori
CHO-DX B11 (также именуемый CHO-DUK)	1980-настоящее время	ауксотрофия по пролину, глицину, гипоксантину, тимидину	CHO-K1 после химического и гамма-облучения
CHO-DG 44	1985-настоящее время	ауксотрофия по пролину, глицину, гипоксантину, тимидину	CHO-Pro-3 после лечения w. МТХ для амплификации генов и Y-лучей
CHO-GS	2004-настоящее время	ауксотрофия по глутамисинтетазе	CHO-K1

¹¹ https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0213

1.5 Разработка стабильных моноклональных клеточных линий-продуцентов рекомбинантных белков на основе клеточной линии СНО

Достижение высокого уровня экспрессии терапевтических рекомбинантных белков возможно благодаря комбинированию нескольких факторов, среди которых наиболее важными являются: экспрессионный вектор, клеточная линия, среда и подкормки для полученных продуцентов, процесс оптимизации культивирования клонов и технология культивирования.

По международным стандартам качества производства биотехнологических препаратов (Q5D Quality of Biotechnological/Biological Products FDA)¹², рекомендуется, чтобы клеточные линии, стабильно продуцирующие рекомбинантные терапевтические белки для коммерческого производства, были моноклональными, т. к. моноклональность обеспечивает идентичность экспрессируемых рекомбинантных терапевтических белков [143]. Также, моноклональная клеточная линия стабильна в отношении качества продукции и ростовых характеристик в течение длительного времени, что благоприятно влияет на долгосрочные промышленные процессы культивирования [144].

На рисунке 5 представлена схема получения промышленного клон-продуцента терапевтического рекомбинантного белка в ходе фармразработки препарата.

¹²<https://www.gmp-compliance.org/guidelines/gmp-guideline/fda-guidance-for-industry-q5d-quality-of-biotechnological-biological-products-derivation-and-characterization-of-cell-substrates>



Рисунок 5. Схема получения стабильных клеточных линий-продуцентов на основе СНО.

1.5.1 Создание минипулов–продуцентов рекомбинантных белков на основе клеточной линии СНО

Трансфекция клеток линии СНО

Экспрессионный вектор должен содержать все регуляторные элементы и обеспечивать экспрессию чужеродного участка ДНК, который будет встроен в геном эукариотической клетки. Вектор подбирается под определенный тип клеток и целевой белок. Стабильная трансфекция осуществляется введением линейризованных генно-инженерных конструкций (ГИК) в клетки линии СНО методом электропорации, с последующей селекцией трансфицированных клеток. Параметры электропорации (напряжение, длительность пульса, количество импульсов) подбирают таким образом, чтобы образовавшееся в результате селекции число позитивных прошедших селекцию минипулов (эффективность трансфекции) составило больше 70%. Перед электропорацией клетки СНО должны быть в логарифмической фазе роста, для более высокой эффективности трансфекции.

Получение минипулов. Селекция

Трансфицированный пул клеток рассеивают на минипулы через 48 часов после трансфекции в среду для культивирования с селективным антибиотиком в 96–луночные планшеты, также для контроля проведения селекции, рассеивают нетрансфицированные клетки отрицательного контроля, в тех же условиях, что и основной эксперимент. Селективный агент выбирают соответственно селективному маркеру в используемой для трансфекции ГИК. После посева на 10–30 96–луночных планшетов, минипулы инкубируют в стационарных условиях и бустрируют селективной средой при наличии конфлоэнта от 50% на 7-10 сутки.

Скрининг и отбор лидерных минипулов

Для отбора лидерных минипулов проводят серию скринингов КЖ минипулов–продуцентов (ИФА, дот-блот анализ, вестерн-блот анализ и т.д.). При наличии 70–100% конфлоэнта у 60% (и более) минипулов, проводят скрининг КЖ 96 луночных планшетов, присвоив при этом каждому минипулу название. Затем лидерные 100–200 минипулов переводят в большой объем ростовой среды в 6–ти

луночные планшеты, после чего также проводят скрининг для отбора более продуктивных минипулов. Далее 20–30 лидерных минипулов переносят в шейкерные колбы для восстановления ростовых характеристик. Названия, присвоенные минипулам, должны сохраняться от начала скрининга и до окончания всего процесса, для обеспечения прослеживаемости полученных результатов.

Криоконсервирование полученных минипулов–продуцентов

После того, как получили минипулы–продуценты, экспрессирующие целевой белок, проводят криоконсервацию всей панели 20–30 лидерных минипулов на 2–4 пассаже по 3–4 ампулы. Повторное создание криобанка клеток лидерных 8–12 минипулов–продуцентов проводят также после проведения периодического культивирования (batch) и после выявления рекомендованных для клонирования минипулов–продуцентов по 6 ампул.

Исследование ростовых и продукционных характеристик минипулов

После восстановления ростовых характеристик 20–30-ти лидерных минипулов, проводят периодическое культивирование в среде с селективным агентом для исследований ростовых и продукционных характеристик культур. Во время данного исследования отбирают пробы каждые сутки, начиная с 72–96 часов культивирования, и проводят определение плотности жизнеспособных клеток (VCD) и жизнеспособности культуры. После окончания процесса культивирования, на 6–8 сутки проводят измерение уровня экспрессии целевого белка в отобранных пробах с помощью ИФА, а также очистку целевого белка с последующим анализом профиля гликозилирования и активности полученного фермента.

После получения всех необходимых данных, выбирают 2–3 минипула–продуцента, удовлетворяющие основным характеристикам, которые будут рекомендованы для получения клонов.

1.5.2 Получение моноклональных клеточных линий-продуцентов рекомбинантных белков на основе клеточной линии СНО

Показатель моноклональности клеточных линий непосредственно влияет на качество биотехнологического продукта, полученного с помощью рекомбинантной ДНК. Биотехнологическое производство характеризуется дорогостоящими расходными материалами и оборудованием, поэтому качество будущего препарата закладывается в самом начале его разработки. Моноклональность культуры положительно повлияет на производственный процесс, критические качества продукта и стабильность клеточной линии [145].

В работе использовали два прибора для получения моноклональных клеточных линий Clone Pix и Cell Metric.

Клонирование методом предельного разведения

Получение моноклональных клеточных линий методом предельного разведения по-прежнему остается часто используемым в наше время. Данный метод основан на статистической вероятности, при котором с помощью последовательного разведения можно достичь чрезвычайно низкой концентрации клеток, а последующий рассев суспензии приведет к получению клеточных линий, происходящих из одной клетки предшественницы. Данный метод обеспечивает относительно высокую статистическую вероятность «моноклональности» клеточной линии, однако очень трудоемкий в микроскопической оценке визуального подтверждения наличия одной клетки в каждой лунке. В работе была использована система фотодокументирования планшетов Cell Metric, которая в автоматическом режиме с высоким разрешением фотографирует дно каждой лунки 96-ти луночного планшета, благодаря чему можно доказать моноклональность полученных клеточных линий.

Фотодокументирование проводят после посева клеток через 4–6 часов, через 18–24 часов, через 48 часов и перед бустированием клонов. Система позволяет увеличить выборку моноклонов, тем самым положительно влияя на процесс разработки клеточной линии в целом.

Клонирование в полутвердую среду

Получение клонов в полутвердой среде проводят с помощью роботизированной системы Clone Pix. Схема клонирования на приборе представлена на рисунке 6–А. Клетки, продуцирующие целевой белок, засевают в полутвердую среду и далее проводят автоматический отбор единичных колоний из полутвердой среды с помощью системы ClonePix в 96–луночные планшеты.

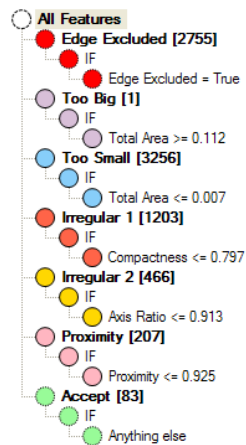
Определенные параметры для отбора выросших колоний (расстояние между колониями, а также их форма и размер) позволяют гарантировать моноклональность, с условием, что концентрация клеток во время засева в полутвердую среду не будет превышать 50 клеток/лунку 6–ти луночного планшета, как заявлено в инструкции-производителя. Программное обеспечение позволяет автоматически учитывать такие особенности выросших колоний, как размер, форма и расстояние между ними.

На рисунке 6–В, С, представлены примеры типовых результатов сортировки колоний. Колонии обычно сортируют и отбирают по шести параметрам: Edge excluded, Too big, Too small, Irregular 1, Irregular 2 и Proximity. Параметр Edge excluded исключает колонии близко расположенные к краю лунки. Параметр Too big–большой размер колонии, исключает нежелательные объекты (например, пузыри) и слишком большие колонии, поскольку вероятнее всего, такие колонии образуются в результате деления более, чем одной клетки. Более того, в очень большой колонии, состоящей более чем из 500 клеток, клетки в середине колонии могут стать нежизнеспособными, из-за нехватки питательных веществ и отсутствия процессов газообмена. Параметр Too small позволяет исключать маленькие по площади колонии, образовавшиеся в результате медленного роста клеток и нежелательные объекты (например, осколки полутвёрдой среды, механические включения и т.д.).

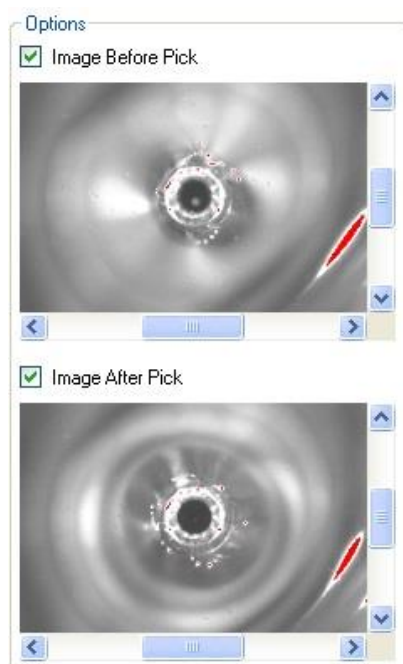
А



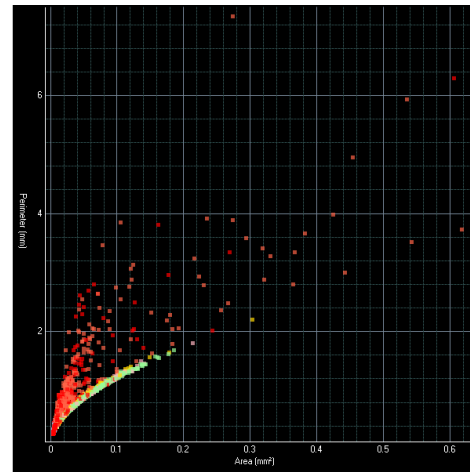
В



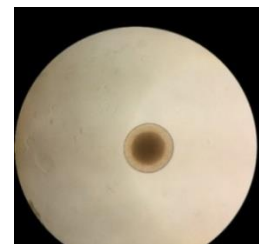
D



C



E



F



Рисунок 6. Принцип работы роботизированной системы отбора клонов Clone Pix. А–Общая схема клонирования с помощью Clone Pix [использовано с изменениями: <https://www.moleculardevices.com>]; В–параметры отбора колоний клеток во время получения клонов; С–распределение колоний по площади и периметру во время получения клонов; D–фотография во время получения клона при помощи встроенной камеры в платформу робота Clone

Pix; E—одиночная колония в полутвердой среде, X10; D—полученный клон в лунке 96—ти луночного планшета.

Параметр Irregular 1 — отражает компактность колонии, идеально круглая колония будет иметь значение 1, а колония с периметром вдвое больше (чем идеально круглая), будет иметь значение 0,5, и так далее. Параметр Irregular 2 — отношение длины колонии к ее ширине. Значение параметров Irregular 1 и Irregular 2 должно быть не менее 0,6, поскольку отобранные колонии в этом случае, можно считать происходящими из одной клетки, а, следовательно, моноклональной популяцией. Параметр Proximity характеризует расстояние между колониями, то есть насколько близко выбранная колония находится к ближайшей соседней колонии. Допустимым значением для достижения моноклональности считается расстояние около ~ 1 мм (30 пикселей). Однако, этот параметр может быть уменьшен до 0,7 мм без значительного увеличения риска, с условием, что остальные параметры будут отрегулированы по более высоким значениям шкалы. В последнем, седьмом фильтре Асепт — указывается число колоний, пригодных для отбора (Рисунок 6—В). Все обнаруженные колонии (Рисунок 6—В), отображаются на графике распределения колоний в зависимости от их периметра и площади, где зеленым отмечены колонии, пригодные для скола (Рисунок 6—С).

Для того, чтобы достичь 99% моноклональности колоний за один этап клонирования, необходимо придерживаться вышеописанных настроек. В противном случае необходимо проводить дополнительный раунд клонирования—субклонирование.

На рисунке 6—D представлена фотография, сделанная с помощью камеры робота Clone Pix в момент захвата колонии клона. На фотографии можно наблюдать колонию в полутвердой среде до ее захвата роботом, и пустое поле внутри пина робота после отбора колонии. Колония в полутвердой среде до момента отбора роботом представлена на Рисунке 6—E. На Рисунке 6—F представлен потенциальный клон—продуцент, отобранный роботом в лунку 96-луночного планшета.

Скрининг и отбор лидерных клонов

Для отбора лидерных клонов проводят серию скринингов КЖ клонов–продуцентов с помощью ИФА (Рисунок 5). Обозначение каждого клона также вводят на первом этапе скрининга 96–луночных планшетов и сохраняют до конца исследования. Выборка клонов на первом этапе состоит примерно из 1000–3000 клонов, затем сокращается до 100–200 клонов и далее 20–30 лидерных клонов–продуцентов переносят в шейкерные колбы. Отбор лидерных клонов, проводят по тем же параметрам, что и минипулы–продуценты, с некоторой поправкой: клоны культивируют без селективного агента.

Криоконсервирование полученных клонов–продуцентов

Лидерные 20–30 клонов–продуцентов, экспрессирующие целевой белок криоконсервируют на раннем 2–4 пассаже по 3–4 ампулы. Повторное создание криобанка клеток лидерных 8–12 клонов–продуцентов проводят также после проведения изучения ростовых и продукционных характеристик всей панели клонов.

Оптимизация культивирования клонов–продуцентов

Для оптимизации роста клонов–продуцентов проводят ряд культивирований всей панели клонов в среде без селективного агента для исследований ростовых и продукционных характеристик культур, в условиях, приближенных к промышленным. Во время данного исследования проводят подсчет VCD, жизнеспособности клонов, отбирают пробы каждые сутки процесса культивирования, также контролируют уровень глюкозы и лактата. Проводят анализ полученных данных, изучают характеристики клонов–продуцентов: динамику жизнеспособности, клеточной плотности, потребления глюкозы и продукции лактата, удельной продуктивности клеточных линий, профиля гликозилирования и активности целевого белка.

1.5.3 Исследование стабильности ростовых и продукционных характеристик клонов–продуцентов

Для изучения стабильности выбирают 8–12 клонов–продуцентов, которые отвечают критически важным характеристикам продукта, таким как высокая волнометрическая продуктивность, способность к достижению высоких клеточных плотностей, схожий с препаратом сравнения профиль гликозилирования белка и ряд других параметров, в зависимости от функции целевого белка. В изучение стабильности роста и продуктивности клонов–продуцентов должны входить следующие основные этапы:

1. Изучение динамики ростовых характеристик и продуктивности в рутинном культивировании в течение 60-ти генераций, для этого клоны–продуценты пересевают через одинаковые промежутки времени через каждые 72–96 часов с одинаковой посевной плотностью жизнеспособных клеток до достижения клеточной культурой в 60 генераций. Каждый пересев клонов проводят подсчет плотности жизнеспособных клеток, % жизнеспособности, отбирают пробы для определения концентрации белка и подсчитывают число генераций.

2. Изучение изменения продуктивности и ростовых характеристик клонов на ранних (0–10) и поздних (50–60) генерациях при культивировании в условиях периодического культивирования. Для этого размораживают клоны на начальных генерациях, и сравнивают в ходе культивирования с этими же клонами на поздних (60+) генерациях.

3. Проводят анализ результатов, полученных в ходе экспериментов, с помощью статистической обработки данных. Выявляют клоны, у которых не наблюдается изменений в ростовых характеристиках и продуктивности на поздних генерациях.

4. Полученные стабильные мноклональные клеточные линии рекомендуют для дальнейшего этапа разработки препарата, а именно масштабирования процесса культивирования.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы

2.1.1 Клеточные культуры

Для получения клеточных линий-продуцентов рекомбинантных ферментов использовали линию клеток СНО-К1, полученную из коллекции клеточных культур НИЦ "Курчатовский институт" (ГосНИИгенетика), которая была адаптирована к условиям суспензионного культивирования без использования сыворотки или любых других компонентов животного происхождения (СНО).

2.1.2 Основные реактивы, растворы и питательные среды

Для приготовления ростовой среды клеток линии СНО использовали очищенную деионизованную воду, порошкообразную среду BalanCD СНО Growth А (BCD) (FujiFilm, США), жидкий L-глутамин (Lonza, Швейцария), смеси сухого пенициллина и стрептомицина для клеточных культур (Биолот, Россия).

Для ИФА, вестерн-блот анализа и определения активности полученного фермента ASB использовали поликлональные крысиные антитела против арилсульфатазы В (АО «Генериум», Россия); поликлональные крысиные антитела против арилсульфатазы В конъюгированные с пероксидазой хрена (АО «Генериум», Россия); субстрат 4-метилумбеллиферил-сульфата-калиевой соли (Sigma, Япония); стандарт флуоресцентного раствора 4-метилумбеллиферона (Sigma, Япония); антитела к формилглицин генерирующему ферменту ab 178809 (Abcam, Великобритания), в качестве стандарта использовали рекомбинантный коммерчески доступный препарат галсульфазу «Наглазим» (BioMarin, США).

Для ИФА, вестерн-блот анализа и определения активности полученного фермента IDS использовали поликлональные крысиные антитела против идуронат-2-сульфатазы (АО «Генериум», Россия); поликлональные крысиные антитела против идуронат-2-сульфатазы, конъюгированные с пероксидазой хрена (АО «Генериум», Россия); субстрат 4-метилумбеллиферил- α -L-идуронид-2-сульфат

натриевой соли (Sigma, Япония); стандарт флуоресцентного раствора 4-метилумбеллиферона (Sigma, Япония), в качестве стандарта использовали рекомбинантный коммерчески доступный препарат идурсульфазу «Элапраза» (Shire, США).

Криозащитную среду для заморозки продуцентов готовили из 45% свежей ростовой среды BCD, 45% кондиционной среды и 10% диметилсульфоксида (Sigma, Япония).

Среда для клонирования на приборе Clone Pix содержала полутвердую среду на основе метилцеллюлозы ClonaCell Flex (STEMCELL, Канада), ростовую 4X среду BCD, 2-х дневную кондиционированную среду, пируват натрия (Lonza, Швейцария), перед добавлением в полутвёрдую среду полученные жидкие смеси фильтровали через мембрану 0,22 мкм.

Среда для клонирования на приборе Cell Metric содержала 50% ростовой среды BCD, 50% 3-х дневной кондиционированной среды, 1мМ пируват натрия (Lonza, Швейцария). Полученную смесь фильтровали через мембрану 0,22 мкм.

2.1.3 Оборудование, использованное в работе

Все манипуляции с клеточными культурами проводили в стерильном ламинаре Logic ClasII Type A2 (Labconco, США) в помещении класса В.

Приготовление необходимых растворов и сред проводили с использованием системы обессоливания воды Milli-Q Advantage EU (Helicon, США).

Стерилизацию лабораторной посуды и растворов проводили с использованием сушильно-стерилизационной системы MOV-212S (Sanyo, Япония).

Вещества взвешивали на весах лабораторных CP3202P-OCE (Sartorius, Германия) и аналитических CP124S (Sartorius, Германия).

Подсчет плотности жизнеспособных клеток и жизнеспособности клеточных культур, а также визуальный контроль роста и морфологии клеток проводили на микроскопе Eclipse TS100 (Nicon, Япония) или на автоматическом счетчике клеток Countess II FL (Thermo Fisher Scientific, США).

Культивирование клеток проводили как в стационарном CO₂-инкубаторе MCO-20AIC (Sanyo; Япония), так и на шейкера-платформе CO₂-инкубатор Multitron Pro (Infors HT, Швейцария) или шейкер-инкубаторе Climo-Shaker ISF1-XC Kuhner (Kuhner, Германия).

Для осаждения клеточных культур использовали центрифугу Centrifuge 5415D и Centrifuge 5810R (Eppendorf, Германия).

Измерение pH растворов, ростовых сред и исследуемых образцов осуществляли с применением pH-метр/иономера SevenEasy S20K (Mettler Toledo, США).

ИФА проводили с помощью промывателя для планшетов PW40 (Bio Rad, Франция); промывателя для планшетов WellWash (Thermo Scientific, Финляндия); спектрофотометра Benchmark Plus Microplate (Bio Rad, США).

Для приготовления образцов для электрофореза использовали нагреватель-термостат сухоблочный DB-2A (IKA, Германия).

Электрофорез осуществляли с применением камеры Mini-Protean (Bio-Rad, США) и источником тока Electrophoresis Power Supply-EPH 601 (SERVA, Испания);

Вестерн-блот анализ осуществляли с помощью системы для блоттинга TE77 ELC SEMI-DRY TRANSFER (Bio Rad, США).

Дот-блот анализ осуществляли с применением системы для блоттинга 96-well ELC SEMI-DRY TRANSFER UNIT (Bio Rad, США).

Результаты дот-блот анализа, вестерн-блот анализа и электрофорегаммы анализировали с помощью прибора гель-документирования ChemiDoc XRS+Molecular Imager (Bio Rad, США).

Транфекцию клеток CHO осуществляли на приборах системы трансфекции Neon Transfection System (Invitrogen, США) и масштабируемой системе трансфекции STX (MaxCyte, США).

Получение моноклональных клеточных линий проводили с помощью роботизированной системы отбора клонов Clone Pix FL (Genetix, США) и высококонтрастной фотодокументирующей системы для идентификации роста моноклональных клеточных линий Cell Metric (Solentim, Великобритания).

Оптимизацию условий культивирования и культивирование с подачей питательных веществ проводили на роботизированной системе 24-х биореакторов AMBR R3–141 Ambr Tap Biosystems (TAP Biosystems, Германия).

2.2 Методы

2.2.1 Молекулярные методы

Получение экспрессионных векторов с генами IDS, ARSB и SUMF1

Синтетические кодон–оптимизированные для экспрессии в клетках CHO гены ферментов I2S, ASB и FGE (кодирующая нуклеотидная последовательность с фланкирующими сайтами рестрикции) были клонированы в экспрессионные вектора с разными селективными маркерами. Экспрессия генов находилась под контролем гибридного CMVe/EF1alpha промотора (Рисунок 7).

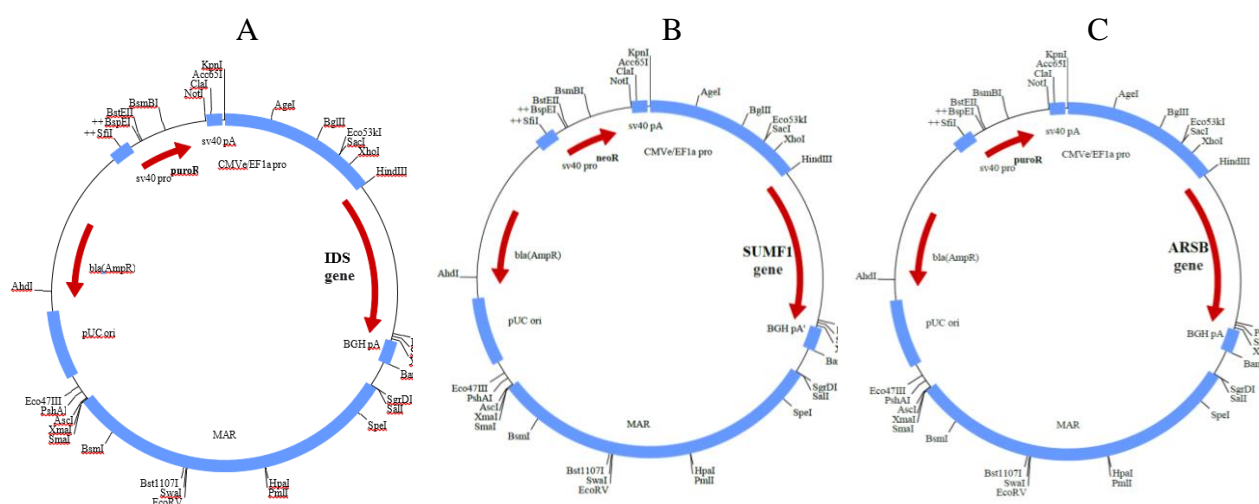


Рисунок 7. Экспрессионные вектора с рекомбинантными генами IDS, ARSB и SUMF1. IDS – ген фермента идуронат-2-сульфатазы; ARSB gene – ген фермента арилсульфатазы B; SUMF1 gene – ген формил генерирующего фермента; BGH pA – сигнал полиаденилирования соматотропина быка; MAR – стабилизирующая эухроматин последовательность; pUC ori – начало репликации; bla (AmpR) – бета–лактамаза, ген устойчивости к ампициллину; sv40pro – ранний промотор SV40; sv40 pA – сайт полиаденилирования SV40; puroR – ген устойчивости к пурамицину; NeoR – ген устойчивости к неомицину; CMVe/EF1a pro – гибридный промотор, состоящий из энхансера вируса CMV и промотора транскрипции гена фактора элонгации.

Рестрикция

Рестрикцию вектора pEcs21, содержащего целевой синтетический ген (IDS, ARSB или SUMF1) и экспрессионного вектора pGNR проводили по фланкирующим сайтам HindIII/XbaI. После рестрикции образцы очищали из агарозного геля с помощью GelExtractionKit (Qiagen) и лигировали с помощью T4 ДНК–лигазы. Полученными плазмидами трансформировали клетки *E. coli* методом теплового шока при температуре +42°C. После наработки плазмид в большом количестве, выделяли плазмидную ДНК с помощью QIAprep Spin Miniprep Kit. Рестрикционный анализ полученных плазмид на наличие клонированных вставок генов проводили эндонуклеазой HindIII/XbaI.

Трансформация клеток *E. coli*

Полученными плазмидами трансформировали клетки *E. coli* методом теплового шока при температуре +42°C. Далее клетки рассеивали на чашки Петри (ЧП) с селективным антибиотиком ампициллином. В качестве отрицательного контроля использовали нетрансформированные клетки *E. coli*. Полученные клоны были перенесены в 3 мл ростовой среды 2YT с добавлением ампициллина 100 мкг/мкл и 2 мМ MgCl₂.

Лигирование

Для лигирования смешивали гены (IDS, ARSB, SUMF1) и экспрессионный вектор в молярном соотношении 3:1. Были созданы плазмиды с геном устойчивости к селективному антибиотику для каждого фермента.

Выделение плазмидной ДНК

После 16 часов культивирования, клетки *E. coli* клонов, содержащие экспрессионные вектора использовали для выделения плазмидной ДНК с помощью набора QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Германия). Далее с помощью эндонуклеаз HindIII/XbaI проводили рестрикционный анализ полученных ДНК на наличие клонированных вставок генов. ДНК последовательность, полученных ГИК была подтверждена секвенированием.

Количественная ПЦР в реальном времени

Количественную ПЦР в реальном времени (qPCR) использовали для оценки экспрессии гена ARSB. Вкратце, РНК экстрагировали из 10^7 клеток с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкциями производителя, и определяли ее концентрацию и целостность. Затем РНК превращали в кДНК с использованием системы синтеза первой цепи SuperScript® IV (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя, используя случайные гексамеры в качестве праймеров. Количественную ПЦР в реальном времени (RT-qPCR) проводили на приборе iCycler (Bio-rad, США) с использованием смеси qPCR mix-HS HighROX (Евроген, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Все значения были нормированы на уровни генов домашнего хозяйства Fkbp1a и Tmed2 [146] с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Данные RT анализировали в программе QBase+ для исследования экспрессии генов. Пары праймеров ОТ-ПЦР показаны в таблице 7.

Таблица 7 – Праймеры для ОТ-ПЦР

Праймеры	Последовательность
ARSB for	GCCCTGATCACCAACCAC
ARSB rev	GGGCTTCAGGTA CTCTCCTC
Fkbp1a for	CTCTCGGGACAGAAACAAGC
Fkbp1a rev	GACCTACACTCATCTGGGCTAC
Tmed2 for	GCCCACATGGATGGGACATAC
Tmed2 rev	TGATGAGCTTCTGTCTCCATGTC

2.2.2. Методы работы с клеточными культурами

Суспензионное культивирование клеток линии СНО

Клетки линии СНО культивировали в суспензионных условиях при $+37^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , с поддержанием постоянной влажности не более 75%, 150 об/мин. Стандартная посевная плотность жизнеспособных клеток составляла $0,3 \times 10^6$ клеток/мл. Ростовая среда - BCD.

Расчет клеточных характеристик

Плотность жизнеспособных клеток определяли в камере Фукса–Розенталя с использованием 0,1% раствора трипанового синего или на автоматическом счетчике клеток Countess II FL (Thermo Fisher Scientific, США).

Время удвоения популяции (PDT, часы) вычисляли по формуле (1):

$$PDT = T \times \frac{LN(2)}{LN\left(\frac{VCD_1}{VCD_0}\right)} \quad (1)$$

T – время культивирования (ч);

LN – натуральный логарифм;

VCD_1 – конечная плотность жизнеспособных клеток;

VCD_0 – начальная плотность жизнеспособных клеток.

Кумулятивная клеточная плотность (CCD, 10^6 клеток×сут/мл) вычисляли по формуле (2):

$$CCD_2 = 0.5 \times (VCD_0 + VCD_1) \times day + CCD_1 \quad (2)$$

CCD_2 – кумулятивная клеточная плотность в день отбора пробы;

CCD_1 – кумулятивная клеточная плотность в предыдущий день отбора пробы;

VCD_0 – начальная плотность жизнеспособных клеток;

VCD_1 – конечная плотность жизнеспособных клеток;

day – число дней культивирования.

Удельная продуктивность (Q_p , пикограмм/клетка/сут) вычисляли по формуле (3):

$$Q_p = \frac{(p_1 - p_0) / (VCD_0 + VCD_1) \times 0,5}{day} \quad (3)$$

p_1 – конечная волюметрическая продуктивность в день пересева (мг/л);

p_0 – начальная волюметрическая продуктивность (в нашем случае=0);

VCD_0 – начальная плотность жизнеспособных клеток (в нашем случае $0,3 \times 10^6$ клеток/мл);

VCD_1 – конечная плотность жизнеспособных клеток в день пересева;

day – число дней культивирования.

Криоконсервирование клеток

Клетки криоконсервировали в логарифмической фазе роста. Необходимый объем суспензии клеток центрифугировали 5 минут при 850 об/мин. Осадок ресуспензировали в криозащитной среде, состоящей из 45% свежей ростовой среды BCD, 45% кондиционной среды и 10% диметилсульфоксида. Клетки

замораживали с концентрацией 10^7 клеток/мл. На криопробирках указывали название проекта, продуцента, пассаж, количество клеток, дату и устойчивость к антибиотикам. Криопробирки помещали в низкотемпературный морозильник (-80°C), затем в сосуд Дьюара с жидким азотом.

Трансфекция клеток линии CHO методом электропорации

Трансфекцию клеток линии CHO проводили на системе электропораций Neon Transfection System (ThermoFisherScientific, США) или на масштабируемой системе трансфекций MaxCyte CTX (MaxCyte, США). За сутки до предстоящей трансфекции клетки линии CHO засеивали плотностью $1,0 \times 10^6$ клеток/мл в среду BCD для логарифмической фазы роста. На следующие сутки клетки осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 800 об/мин. Осадок ресуспендировали в буфере для электропорации, после чего отбирали суспензию клеток и смешивали с плазмидой. Контрольную электропорацию проводили без добавления плазмиды.

Получение минипулов

Трансфицированные клетки высевали в концентрации $5,0 \times 10^4$ клеток/мл в плоскодонные 96-луночные планшеты по 100 мкл/лунку в среде BCD с селективными антибиотиками (5 мг/л пурамицина и/или 500 мг/л неомицина). Гетерогенные клеточные линии, продуцирующие целевой фермент (минипулы), культивировали в стационарных условиях в течение 12-18 суток при $+37^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 и влажности не более 70%. Затем проводили скрининг минипулов из 96-луночных планшетов, после чего, минипулы с самой высокой продуктивностью переводили в больший объем 6-луночных планшетов. Далее проводили скрининг минипулов из 6-луночных планшетов, после чего переводили минипулы с максимальной продуктивностью в колбы для шейкерного культивирования.

Приготовление кондиционной среды

Провести рассев клеток–продуцентов за 24 часа до клонирования по $0,3 \times 10^6$ клеток/мл в ростовую среду BCD и культивировать в стандартных условиях роста при $+37^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 и влажности не более 70% в CO_2 -инкубаторе. На следующие сутки осадить клетки путем центрифугирования в течение 5 минут при 800 об/мин,

после чего провести стерильную фильтрацию с полученной КЖ через шприц с фильтрующей стерильной насадкой 0,22 мкм.

Получение клонов в полутвердой среде

Лидерный минипул–продуцент в логарифмической фазе роста засеивали в готовую полутвердую среду ClonaCell Flex (STEMCELL, Канада) с посевной концентрацией 10 клеток/мл. Планшеты с растущими колониями инкубировали 8–10 дней в стационарных условиях при +37°C, 5% CO₂ и влажности не более 70% в CO₂–инкубаторе (Sanyo, Япония). Отбор клонов проводили с помощью роботизированной системы Clone Pix, оценивая такие параметры клонов, как размер колонии, компактность, удаленность колоний друг от друга. Колонии исключали по следующим параметрам: близкое расположение к краю лунки; большой размер колонии, $\geq 0,7\text{мм}^2$; маленькие по площади колонии, $\leq 0,01\text{мм}^2$; компактность колонии, $\leq 0,7$; отношение длины колонии к ее ширине, $\leq 0,7$; насколько близко колония располагается к соседней колонии, ≤ 1 .

Получение клонов методом предельного разведения

Минипул–продуцент ASB был клонирован методом предельного разведения в ростовой среде BCD в 96–ти луночные планшеты. Посевную концентрацию клеток доводили до 5 клеток/мл и засеивали по 100 мкл в лунку 96–ти луночного планшета. Для отслеживания и фотодокументирования роста клонов использовали автоматическую систему Cell Metric (Solentim, Великобритания), фотографировали планшеты сразу через 4 часа после клонирования, на 24 и 48 часов после засева культуры и на 6 и 12 сутки роста моноклиональных клеточных линий.

Периодическое культивирование с подпиткой

Культивирование проводили в колбах Erlenmeyer cell culture flasks (Corning Inc., США) в шейкерном инкубаторе Infors HT Multitron (Infors, США), в минибиореакторах TubeSpin Bioreactor 50 (TPP Techno Plastic Products AG, Швейцария) в шейкерном инкубаторе ClimoShaker ISF1–XC (Kuhner, Германия) и в роботизированной системе минибиореакторов ambr® 15 cell culture Ambr Tap Biosystems (Sartorius, Германия). Посевная концентрация клеток составляла 0,3–0,5×10⁶ клеток/мл. Росточная среда – BCD, содержание CO₂ – 5%, влажность – не

более 70%. Для каждого эксперимента использовали свои компоненты и добавки, температурный режим – +37°C со снижением температуры до +32°C, концентрация сульфата меди и/или хлорида кальция – 300мкМ (при использовании). Отбор проб КЖ и подсчет плотности жизнеспособных клеток проводили каждый день, начиная с 72 часов культивирования. Далее, проводили ИФА для определения концентрации целевого белка в КЖ. Процесс культивирования завершали после снижения жизнеспособности клеток до 70%.

Периодическое культивирование

Культивирование проводили в колбах Erlenmeyer cell culture flasks (Corning Inc., США) или TubeSpin Bioreactor (Techno Plastic Products AG, Швейцария). Посевная концентрация клеток $0,3-0,5 \times 10^6$ клеток/мл. Ростовая среда–BCD, содержание CO₂ - 5%, влажность - не более 70%, температурный режим - +37°C. Отбор проб КЖ и подсчет плотности жизнеспособных клеток проводили каждый день, начиная с 72 часов культивирования. Далее, проводили ИФА для определения концентрации целевого белка в КЖ. Процесс культивирования завершали после снижения жизнеспособности клеток до 70%.

Контроль DO и pH в минибиореакторе ambr®15

Каждый биореактор ambr®15 имеет сенсорный датчик, измеряющий DO и pH. Датчики работают по принципу возбуждения/излучения флуоресценции. Измерения DO и pH проходит каждые 90 секунд. Контроль DO происходит за счет контролируемой общей подачи объема кислорода в каждый минибиореактор. Контроль pH осуществлялся системой ambr®15 автоматически, pH регулировался не выше 7,2 с помощью автоматической подачи газа CO₂ в каждый минибиореактор.

Изучение стабильности ростовых характеристик и продуктивности клонов в течение 60-ти генераций

Динамику ростовых характеристик и продуктивности клонов изучали в рутинном культивировании в течение 60-ти генераций, для этого клоны–продуценты пересеивали каждые 72–96 часов (режим посева 3–4–3–4 дня) с посевной плотностью жизнеспособных клеток $0,3 \times 10^6$ клеток/мл. Отбор проб для

подсчета плотности жизнеспособных клеток, жизнеспособности и определения титра целевого белка методом ИФА проводили при каждом пересеве культуры на протяжении более 60-ти клеточных поколений (число удвоений популяции). Условия культивирования: температурный режим +37°C, влажность 70%, содержание CO₂ 5%; объем ростовой среды VCD в TubeSpin Bioreactor (Techno Plastic Products AG, Швейцария) 15 мл, скорость перемешивания 200 об/мин.

Периодическое культивирование клонов на ранних и поздних поколениях

Размораживали клоны ранних (3–6 пассаж) и поздних (18–22 пассаж) поколений для сравнительного анализа роста и продуктивности культур после 60 поколений. Посевная плотность $0,3 \times 10^6$ клеток/мл, температурный режим +37°C, влажность 70%, содержание CO₂ 5%; объем ростовой среды VCD 20 мл. Отбор проб КЖ и подсчет плотности жизнеспособных клеток проводили каждый день, начиная с 72 часов культивирования. Далее, проводили ИФА для определения концентрации целевого белка в КЖ. Процесс культивирования завершали после снижения жизнеспособности клеток не ниже 70%.

Приготовление лизатов клеток

Для получения проб лизатов клеток, суспензию клеток (2×10^6 клеток/мл) осаждали центрифугированием при 800 об/мин 5 минут, супернатант удаляли, осадок промывали в PBS. После промывки клетки осаждали центрифугированием при 800 об/мин 5 минут, супернатант сливали и клетки ресуспендировали в 100 мкл однократного денатурирующего буфера с 2–меркаптоэтанолом и прогревали 10 минут при +95°C.

2.2.3 Биохимические, физико-химические и иммунохимические методы

Хроматографическая очистка арилсульфатазы В

Для очистки использовали три стадии выделения. Целевой белок из КЖ захватывали на аффинном сорбенте Con A–sepharose (GE, США). Фермент доочищали метал–хелатной хроматографией на IMAC sepharose FF (GE, США) с

иммобилизованными ионами меди и катионообменной хроматографией на SP-sepharose (GE, США).

Хроматографическая очистка идуронат-2-сульфатазы

Выделение белка из образцов КЖ проводили анионообменной хроматографией на сорбенте Giga Cap Q 650 M (Tosoh, Япония) при pH 6,5 с последующей гидрофобной хроматографией на Phenyl Sepharose (GE, США). Доочистку проводили на колонке с анионообменным сорбентом высокого разрешения YMC Q10 (YMC, Япония) в линейном градиенте хлорида натрия.

Иммуноферментный анализ

Для сорбции фермента ASB использовали поликлональные крысиные антитела против арилсульфатазы В (АО «Генериум», Россия).

Для сорбции фермента I2S использовали поликлональные крысиные антитела против идуронат-2-сульфатазы (АО «Генериум», Россия).

Антитела для сорбции разводили в карбонатно-бикарбонатном буфере до концентрации 5 мкг/мл и вносили по 100 мкл на лунку 96-луночного сорбционного планшета MaxiSorb (NUNC, Дания). Промывку проводили буфером PBS-T. Блокировку осуществляли раствором PBS-Ta. Разведённые образцы и стандартный контрольный белок наносили в лунки по 100 мкл. Инкубировали 1 час при +37°C на орбитальном шейкере при 300 об/мин.

Детектирующие антитела для фермента ASB – поликлональные крысиные антитела против арилсульфатазы В конъюгированные с пероксидазой хрена (АО «Генериум», Россия).

Детектирующие антитела для фермента I2S – поликлональные крысиные антитела против идуронат-2-сульфатазы, конъюгированные с пероксидазой хрена (АО «Генериум», Россия).

Добавляли детектирующие антитела добавляли по 100 мкл на лунку, в блокирующем растворе 1:10000. Промывку проводили буфером PBS-T. Затем добавляли раствор ТМБ по 100 мкл. Для остановки реакции добавляли СТОП-раствор (0,5М H₂SO₄). Измерения проводили на приборе Benchmark Plus, Bio-Rad при OD – 450 нм.

Пробы для электрофореза

КЖ продуцентов в объеме 150 мкл смешивали с 50 мкл 4X денатурирующего буфера для образцов, после чего образцы прогревали в течение 10 мин при +95°C и наносили на 8–10% SDS–PAGE. Для визуализации белков в SDS–PAGE добавлен трихлорэтанол (0,6 % в геле). Сигнал детектировали при помощи системы гельдокументирования ChemiDoc XRS+Molecular Imager и программного обеспечения Image Lab, Version 3.0.

Вестерн–блот анализ

Осуществляли перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану под действием электрического тока. Затем инкубировали мембрану в блокировочном растворе (5 % молоко в PBS). После блокировки, мембрану переносили в раствор антител (поликлональные крысиные антитела против арилсульфатазы В конъюгированные с пероксидазой хрена (АО «Генериум», Россия) в буфере 5 % молоко в PBS) в течение 1 часа. Отмывали мембрану в PBS–T 4 раза по 5 минут на орбитальном шейкере Titramax 1000 (Heidolph, Германия). Наносили проявочный раствор Western Bright ECL Western Blotting detection kit (BioRad, США). Сигнал детектировали при помощи системы гельдокументирования ChemiDoc XRS+Molecular Imager и программного обеспечения Image Lab, Version 3.0. В случае окрашивания лизатов использовали следующую пару антител, детектирующих вспомогательный FGE: поликлональные кроличьи антитела к SUMF1 ab 178809 (Abcam, Великобритания) и ослиные моноклональные антитела к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (GE Healthcare Life Sciences, США).

Дот–блот анализ

Собирали систему для дот–блоттинга Minifold–I DOT–BLOT (GE Healthcare Life Sciences, Швеция) с нитроцеллюлозной мембраной Nitrocellulose Membrane, Precut, 0,45 мкм (BioRad, США), через которую с помощью вакуумного насоса прокачивали КЖ определенного объема (50–250 мкл); далее разбирали систему и переносили мембрану в блокировочный раствор. Инкубировали 1 час (Ткомн., шейкер 50 об/мин); После блокировки мембрану переносили в раствор с окрашивающими антителами в течение 1 часа (поликлональные крысиные

антитела против арилсульфатазы В конъюгированные с пероксидазой хрена (АО «Генериум», Россия), (Ткомн., шейкер 50 об/мин); отмывали мембрану в PBS-T 4 раза по 5 минут (Ткомн., шейкер 80 об/мин); Затем мембрану помещали на ровную поверхность и наносили раствор Western Blotting detection kit (BioRad, США) на 1 минуту при комнатной температуре. Сигнал детектировали при помощи системы гельдокументирования ChemiDoc XRS+Molecular Imager и программного обеспечения Image Lab, Version 3.0.

Измерение активности идуронат-2-сульфатазы

Метод основан на способности фермента I2S отщеплять сульфатные остатки от субстрата 4-метилумбеллиферил- α -L-идуронид-2-сульфата натрия (Sigma, Япония) и дальнейшем гидролизе образованного субстрата 4-метилумбеллиферил- α -L-идуронид под действием α -L-идуронидазы, в результате которого образуются флуоресцентный продукт 4-метилумбеллиферон и идуроновая кислота. Сигнал флуоресценции измеряли при 365/460 нм с помощью фотометра Synergy HTX (BioTek, США). Единицей активности I2S принимали количество фермента, способного катализировать гидролиз 1 нмоля субстрата 4-метилумбеллиферил- α -L-идуронид-2-сульфата натрия (нмоль/мл) при 37 °С, pH 4,9-5,1, в течение 1 мин. Активность I2S в испытуемых образцах (А), выраженную в ЕД/мкг, вычисляли по формуле (4):

$$A = 0,26 \times \frac{(m - m_0) \times 1000}{240 \times C \times 0.01}, \quad (4)$$

где: m - содержание 4-метилумбеллиферона, полученное в ходе реакции в лунках с данным разведением испытуемого раствора, нмоль/мл;

m₀ - содержание 4-метилумбеллиферона, полученное в ходе реакции в лунках с раствором сравнения, нмоль/мл;

0,26 - финальный объем разведений стандартного раствора и испытуемого раствора, внесенных в лунки планшета для измерения сигнала флуоресценции, мл;

240 - время реакции, мин;

C - содержание I2S в каждом из приготовленных разведений испытуемого раствора, нг/мл;

0,01 - объем разведений испытуемого раствора, мл;

1000 - коэффициент пересчета нг в мкг.

Измерение активности арилсульфатазы В

В основе метода оценки активности ASB лежит способность фермента отщеплять сульфатные остатки от молекулы субстрата – 4-метилумбеллиферил-

сульфата-калиевой соли (Sigma, Япония). В результате реакции образуется флуоресцирующий продукт – 4-метилумбеллиферон. Уровень флуоресценции продукта реакции и стандартного раствора 4-метилумбеллиферона (Sigma, Япония) измеряли при 365/460 нм с помощью фотометра Synergy HTX (BioТек, США). Единицей активности АSВ считали количество фермента, способного катализировать расщепление 1 мкмоль субстрата 4-метилумбеллиферил-сульфата-калиевой соли при 37 °С, рН 4,9–5,1, в течение 1 мин. Активность АSВ в испытуемых образцах (*A*), выраженную в ЕД/мл, вычисляли по формуле (5):

$$A = \frac{(F_{\text{обр}} - F_{\text{сравн}}) \times 1 \times D}{30 \times 0,05 \times 1000}, \quad (5)$$

где: *F*_{обр} – количество 4-метилумбеллиферона, образованное в реакционной смеси с испытуемыми образцами, вычисленное относительно калибровочного графика (нмоль);
*F*_{сравн} – количество 4-метилумбеллиферона, образованное в реакционной смеси с раствором сравнения, вычисленное относительно калибровочного графика (нмоль);
D – фактор разведения испытуемых образцов;
 30 – время реакции (мин);
 0,05 – объем разведенного испытуемого образца, внесенного в лунку (мл);
 1000 – коэффициент пересчета единиц измерения.

Определение уровня лактата и глюкозы в КЖ

Уровни лактата и глюкозы в кж определяли на приборе Biosen С–line (EKF–diagnostic GmbH, Германия) согласно инструкции производителя.

2.2.4 Статистические методы обработки результатов исследований

Расчеты и построение графиков осуществляли с применением программы Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation) и статистической программы Graph Pad Prism 6 (One–Way ANOVA и t–test). На рисунках, представленных в работе, использовали следующие обозначения: **** - $p_{\text{value}} < 0,0001$, *** - $p_{\text{value}} < 0,001$, ** - $p_{\text{value}} < 0,01$, * - $p_{\text{value}} < 0,05$, ns – нет статистической разницы.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ И ТЕХНОЛОГИИ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДЛЯ ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО АКТИВНОГО ФЕРМЕНТА ИДУРОНАТ-2-СУЛЬФАТАЗЫ

3.1 Трансфекция клеток CHO плазмидой, содержащей ген IDS

Трансфекцию проводили электропорацией на приборе NEON (Invitrogen). Клетки CHO рассеивали в плотности $0,3 \times 10^6$ клеток/мл за сутки до трансфекции. Для трансфекции использовали линейризованную плазмиду pGNR-IDS с целевым геном, кодирующим фермент I2S. Через 24 и 48 часов после электропорации определяли жизнеспособность и плотность жизнеспособных клеток (Таблица. 8). Также была проведена контрольная трансфекция клеток CHO без использования плазмиды, для выявления влияния процесса электропорации на жизнеспособность клеток данной линии (Таблица 8, 9).

Таблица 8 – Условия трансфекции клеток CHO плазмидой, содержащей ген IDS

Плаزمида	Селективный маркер	Буфер R, мкл	Клеток CHO, 10^6 клеток	Ударов на лунку	Лунок (24-х)
pGNR-IDS	неомицин	260 ul	4,1	3	8
Контроль, без плазмиды	–	40	0,5	3	1

Таблица 9 – Жизнеспособность клеточных пулов CHO после электропорации плазмидой, содержащей ген IDS

Плазмида	№ лунки	Время после трансфекции, ч			
		24		48	
		VCD, mln/ml	Viability, %	VCD, mln/ml	Viability, %
pGNR-IDS	1	0,54	61	0,48	46
	2	0,50	69	0,48	55
	3	0,34	67	0,30	61
	4	0,39	65	0,31	54
	5	0,25	62	0,44	74
	6	0,45	66	0,44	54
	7	0,21	65	0,29	71
	8	0,58	67	1,23	88
Контроль CHO без плазмиды	9	0,33	92	1,11	86

Трансфекция клеток прошла успешно. Через 48 ч культивирования был проведен рассев на минипулы в селективную среду на десять 96-луночных планшетов. По результатам жизнеспособности перед рассевом на минипулы были объединены лунки: № 5, 7, 8 – высокая жизнеспособность после проведения электропорации 74–88 %; № 1, 2, 3, 4, и 6 – средняя жизнеспособность после проведения электропорации 46–61 % (Таблица 9). Рассев проводили в ростовую среду VCD с селективным антибиотиком 600 мкг/мл неомицина. Планшеты инкубировали в стационарных условиях в CO₂ инкубаторе как описано в методах исследования.

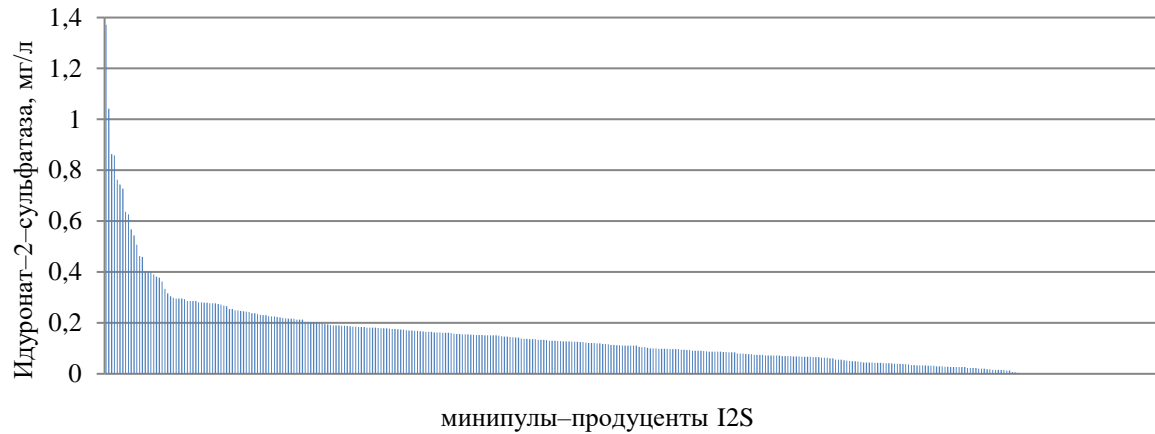
3.2 Получение минипулов–продуцентов идуронат–2–сульфатазы

Конфлюэнтность минипулов к 7 суткам роста в стационарных условиях на момент бустирования достигла 50%. Скрининг проб КЖ минипулов из 96-ти луночных планшетов методом ИФА был проведен на 12 сутки роста минипулов (Рисунок 8–А). Максимальная продуктивность минипулов достигала 1,37 мг/л. Затем, 100 минипулов, имеющих, максимальную продуктивность были перенесены в 6-ти луночные планшеты в 3 мл ростовой селективной среды VCD. Далее на 7-е сутки провели скрининг проб КЖ минипулов из 6-ти луночных планшетов методом ИФА, максимальная продуктивность составила 2,1 мг/л (Рисунок 8–В). По результатам данного скрининга, 20 лидерных минипулов были переведены в колбы на шейкерное культивирование.

Был создан криобанк клеток всей панели лидерных минипулов-продуцентов на раннем пассаже по 4 ампулы каждого.

Для выявления наиболее подходящий кандидатов было проведено периодическое культивирование минипулов-продуцентов в течение 6 суток. На Рисунке 9 представлены результаты проведенного эксперимента. Максимальная продуктивность составила 38 мг/л (Рисунок 9–С). Минипулы: mp_22, mp_12, mp_13 и mp_11 были отмечены как способные достигать высоких клеточных плотностей с максимальным выходом белка (Рисунок 9–D).

А



В



Рисунок 8. Диаграмма распределения минипулов–продуцентов по продуктивности в результате скринингов методом ИФА: А–96–ти луночных планшетов, мг/л; В–6–ти луночных планшетов, мг/л.

После проведения выделения и очистки фермента лидерных кандидатов и определения его профиля гликозирования, для клонирования был рекомендован минипул-продуцент mp_13.

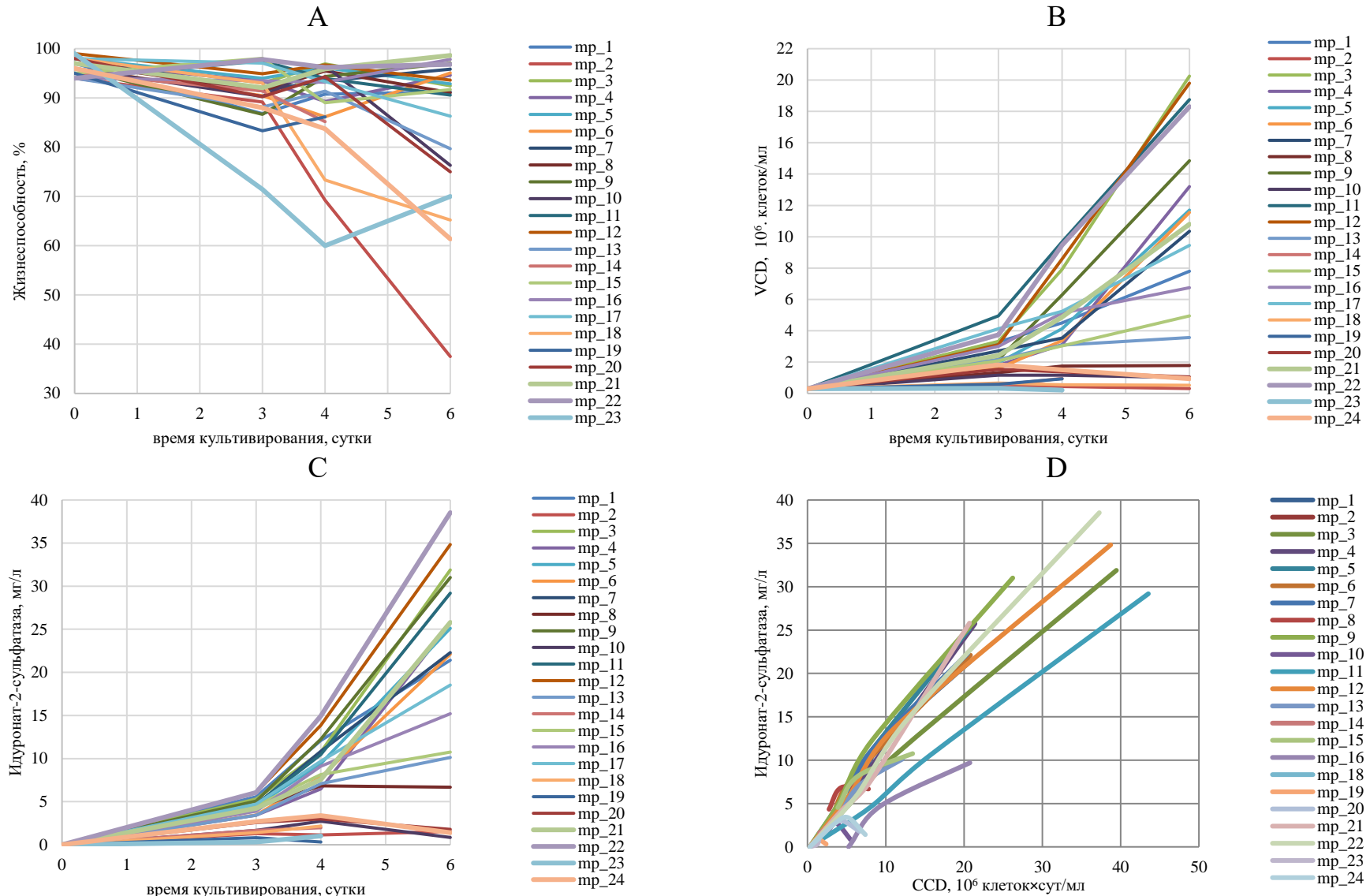


Рисунок 9. Периодическое культивирование 24-х минипулов-продуцентов I2S. А – жизнеспособность; В – плотность жизнеспособных клеток; С – волюметрическая продуктивность; Д – зависимость кумулятивной клеточной плотности от продуктивности.

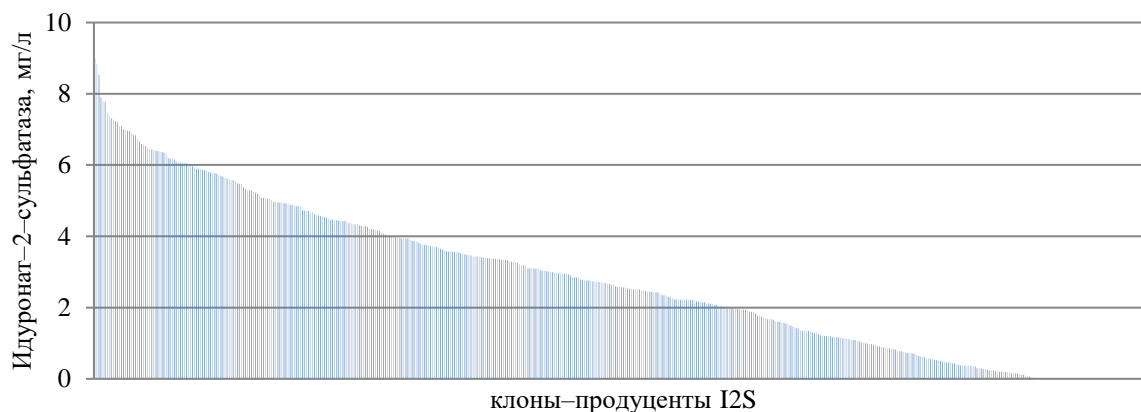
3.3 Получение клонов–продуцентов идуронат–2–сульфатазы

Клоны I2S были получены с помощью робота Clone Pix. Для определения наиболее продуктивных моноклональных клеточных линий проводили скрининг проб КЖ клонов методом ИФА. Диаграмма распределения 1144 клонов из 96–ти луночных планшетов по продуктивности представлена на рисунке 10–А. По результатам проведенного скрининга были выбраны 165 клонов (с продуктивностью больше 2,0 мг/л) для переноса в больший объем в 2 мл селективной ростовой среды BCD. В результате скрининг клонов из 6–ти луночных планшетов методом ИФА на 5 сутки культивирования, было перенесено 24 клона–продуцента I2S в TubeSpin Bioreactor (Рисунок 10–В). Далее провели несколько пассажей клонов для стабилизации их ростовых характеристик в условиях суспензионного культивирования. После чего 4–е клона были исключены из дальнейших экспериментов поскольку имели низкую жизнеспособность и высокую способность к агрегации клеток.

Клоны I2S оценивали по параметрам: динамика жизнеспособности культуры; динамика плотности жизнеспособных клеток; концентрация целевого белка в КЖ; зависимость волнометрической продукции от кумулятивной плотности клеток.

Снижение жизнеспособности клонов–продуцентов наблюдали на 6–е сутки культивирования (Рисунок 11–В). Жизнеспособность выше 70% на седьмые сутки культивирования наблюдали для клонов ST–4, ST–1, ST–20, ST–3, ST–8, ST–15, ST–12, ST–6, ST–2, ST–7. Динамика плотности жизнеспособных клеток клонов представлена на рисунке 11–А, где максимальная клеточная плотность составила $2,0 \times 10^7$ клеток/мл. Наибольшие плотности жизнеспособных клеток выше $1,6 \times 10^7$ клеток/мл были отмечены для клонов: ST–19, ST–18, ST–16, ST–5, ST–20, ST–13, ST–12, ST–9, ST–4.

А



В

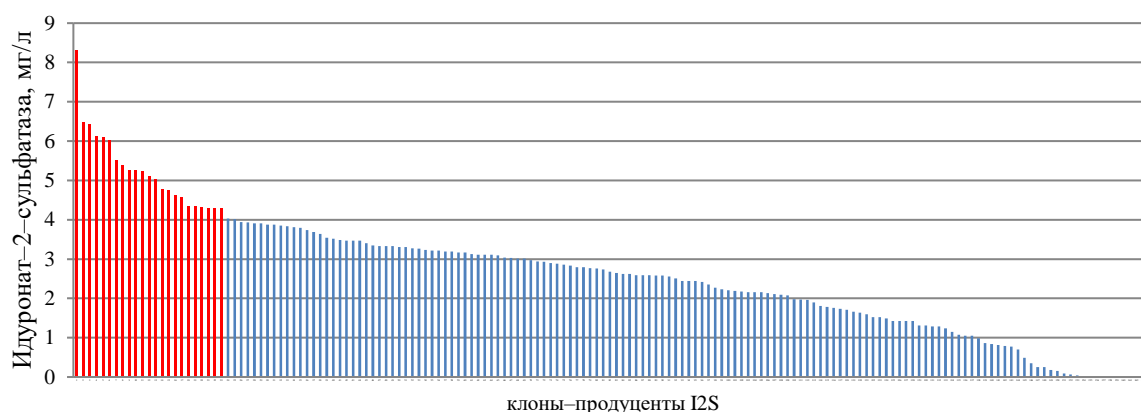


Рисунок 10. Диаграмма распределения клонов по продуктивности во время скринингов методом ИФА: А–96-ти луночных планшетов, мг/л; В–6-ти луночных планшетов, мг/л. Красным выделены продуценты, отобранные для дальнейшей работы.

Максимальная продуктивность клонов составила 45 мг/л. Клоны, имеющие продуктивность выше 40 мг/л: ST-5, ST-2, ST-13, ST-9 (Рисунок 11-С). На рисунке 11-Д представлена зависимость продуктивности клонов I2S от кумулятивной клеточной плотности. Данная зависимость позволяет выявить клоны с максимальной продуктивностью и высокой плотностью жизнеспособных клеток в суспензионной культуре. К таким клонам можно отнести ST-5, ST-2, ST-13 и ST-9 (Рисунок 11-Д).

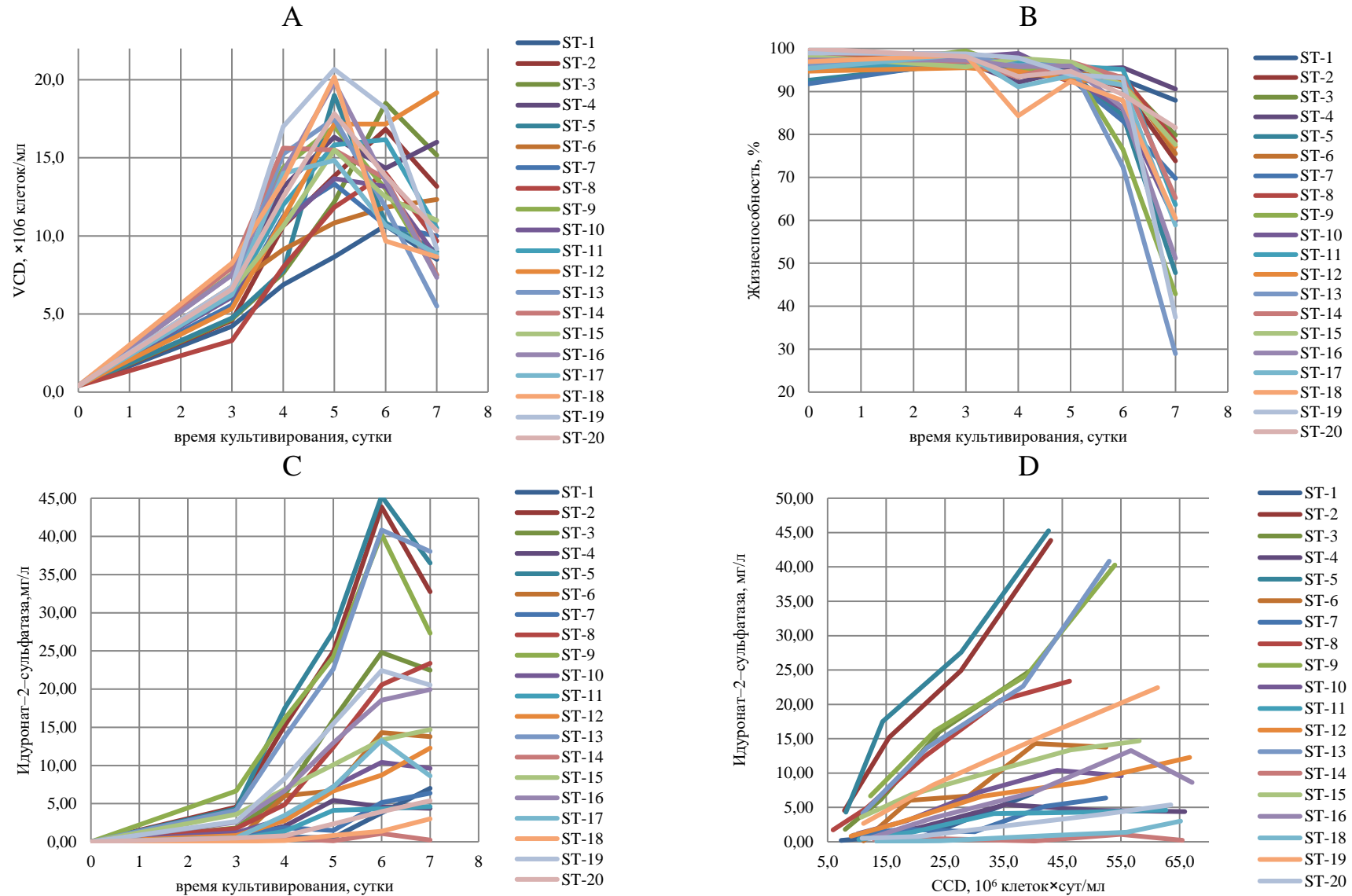


Рисунок 11. Ростовые и продукционные характеристики клонов–продуцентов I2S. А – плотность жизнеспособных клеток, 10⁶ клеток/мл; В – жизнеспособность культур, %. С – волюметрическая продуктивность, мг/л; D – зависимость продуктивности от кумулятивной клеточной плотности, 10⁶ клеток×сут/мл.

В результате работы была получена панель клонов–продуцентов рекомбинантного лизосомального фермента I2S. Исследовательский банк был создан для всех лидерных продуцентов I2S на основе клеток линии СНО. Клон ST–5, обладающий высоким уровнем экспрессии целевого фермента и способностью к высоким плотностям жизнеспособных клеток при культивировании, был выбран для дальнейших экспериментов.

3.4 Оптимизация состава ростовой среды для культивирования клона с целью увеличения удельной активности идуронат–2–сульфатазы

Периодическое культивирование лидерного клона ST–5 с целью повышения удельной активности лизосомального фермента I2S было проведено в среде BCD в двух условиях: с добавлением 300 мкМ сульфата меди и без добавления.

Добавление ионов меди в ростовую среду BCD не повлияло на динамику плотности жизнеспособных клеток (Рисунок 12–В) и жизнеспособности (Рисунок 12–А) 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 было отмечено при культивировании с добавлением в ростовую среду сульфата меди (Рисунок 12–С). Также наблюдали увеличение продуктивности клона–продуцента ST–5, примерно на 30% с 120 мг/л до 180 мг/л (Рисунок 12–D), с добавлением в ростовую среду ионов Cu^{2+} .

Этот эксперимент наглядно подтверждает гипотезу о влиянии ионов Cu^{2+} как кофактора вспомогательного белка FGE, который в свою очередь влияет на активность лизосомального фермента I2S во время биосинтеза белка (Рисунок 12–С). Дальнейшие эксперименты по подбору условий повышения продуктивности клона–продуцента и активности I2S проводили с добавлением в ростовую среду ионов Cu^{2+} .

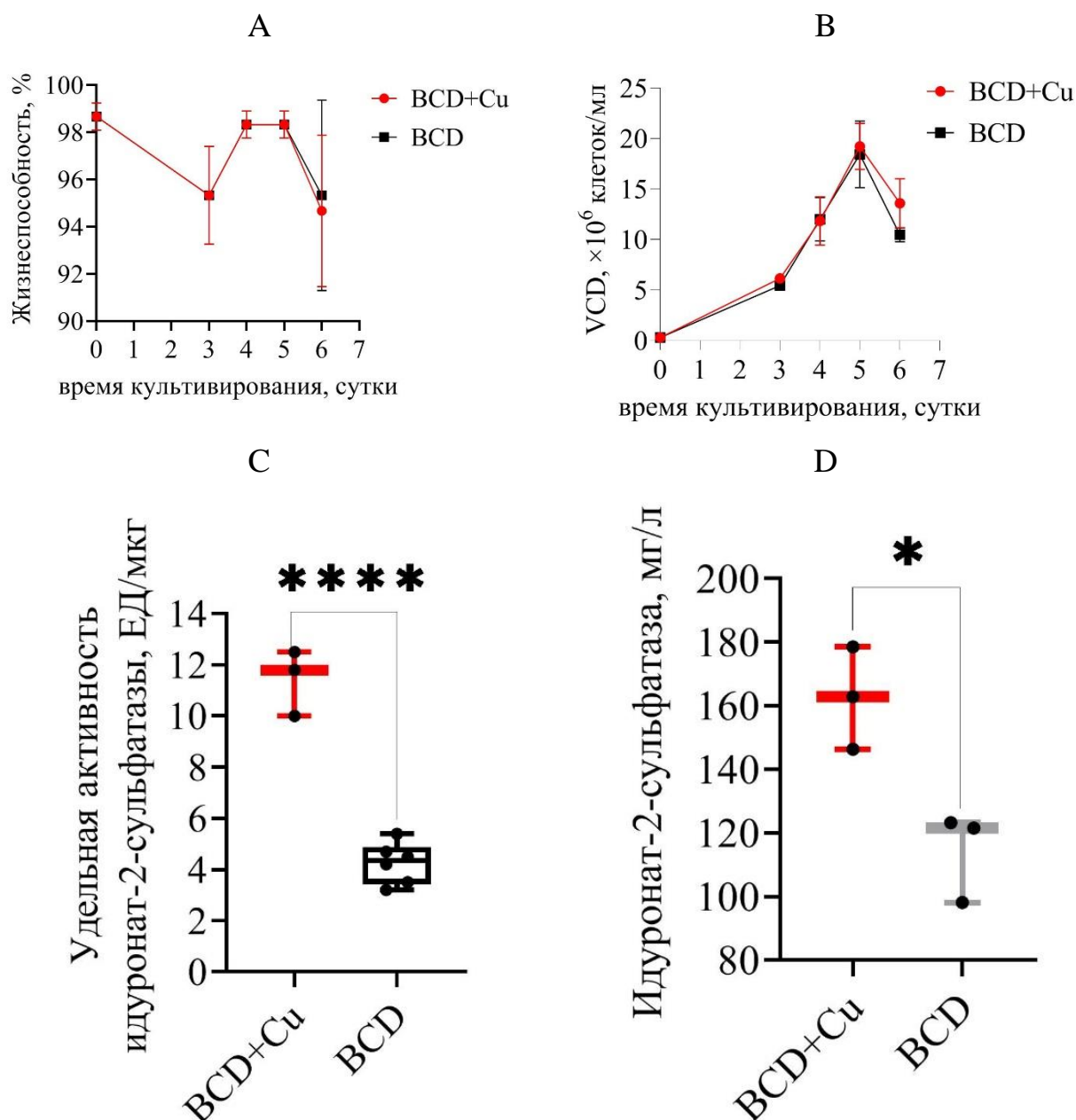


Рисунок 12. Влияние сульфата меди на продукционные и ростовые характеристики клона–производителя I2S в режиме периодического культивирования. А – жизнеспособность клеток, %; В – плотность жизнеспособных клеток, 10^6 клеток/мл; С – удельная удельная активность фермента I2S, ЕД/мкг; D – продуктивность клона–производителя I2S на 12 сутки культивирования, мг/л; (n=3), данные представлены в виде среднего значения и \pm стандартной ошибки среднего (SEM). BCD – клоны-производители, культивируемые на среде BalanCD; BCD+Cu – клоны-производители, культивируемые на среде BalanCD с добавлением сульфата меди.

3.5 Оптимизация процесса культивирования клона-продуцента идурилат-2-сульфатазы с целью подбора оптимального компонента для фидирования

Далее проводили эксперименты по определению оптимального компонента подпитки: feed 2, feed 3 или feed 4, с целью повышения экспрессии I2S при культивировании. Клон ST-5 культивировали в минибиореакторах ambr® 15 cell culture AMBR, что позволило имитировать процесс культивирования в промышленном биореакторе и обеспечить идентичные условия, оптимальные для роста культур клеток. Исходя из предыдущего эксперимента, для активности фермента I2S в ростовую среду было добавлено 300 мкМ сульфата меди.

Процесс культивирования был остановлен после снижения жизнеспособности клеток клона до 70% на 12 сутки (Рисунок 13-В). Наблюдали одинаковую динамику роста плотности жизнеспособных клеток при добавлении feed 2 и feed 3, а при добавлении feed 4 была замечена опережающая динамика увеличения плотности жизнеспособных клеток (Рисунок 13-А). Высокую продуктивность наблюдали с использованием подпитки feed 4—около 500 мг/л, затем feed 2—около 330 мг/л и feed 3—около 290 мг/л (Рисунок 13-С). Динамика титра целевого белка I2S в КЖ представлена на рисунке 13-Д.

Скорость потребления глюкозы и накопления лактата отражают метаболическую активность клеток [147; 148]. Накопление токсичных побочных продуктов, таких как лактат [149], ингибирует рост клеток и продукцию белка [150]. Добавление глюкозы, как основного источника питания клеток, дает возможность продлевать процесс культивирования. На рисунке 13-Е, F представлен уровень лактата и глюкозы во время проведения эксперимента. Более интенсивное потребление глюкозы наблюдали у клона с добавлением подпитки feed 4 (Рисунок 13-F). Это коррелирует с динамикой плотности жизнеспособных клеток на данной подпитке (Рисунок 13-В).

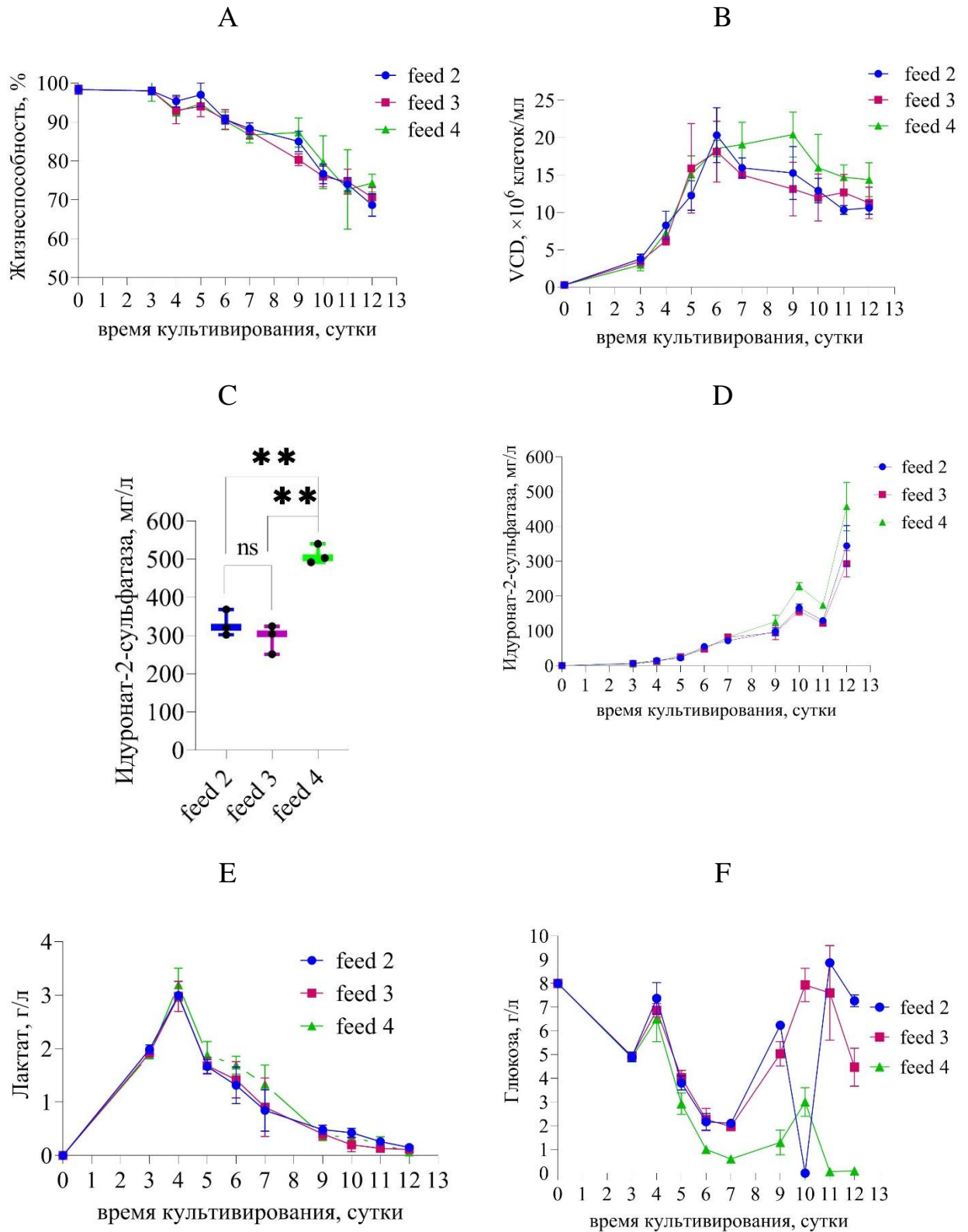


Рисунок 13. Подбор подкормки для культивирования клона I2S.

A – плотность жизнеспособных клеток, 10^6 клеток/мл; B – жизнеспособность клеток, %; C – продуктивность клона I2S на 12 сутки культивирования, мг/л; D – динамика продуктивности клона, мг/л; E – уровень лактата в КЖ, г/л; F – уровень глюкозы в КЖ, г/л; (n=3), данные представлены в виде среднего значения и \pm стандартной ошибки среднего (SEM).

Уровень OD и pH контролировался автоматически системой AMBR (Рисунок 14–А, В). Следует отметить, что на рисунке 14–А для feed 4, уровень потребления кислорода культурой намного интенсивнее, что говорит о более быстрых метаболических процессах и более интенсивном росте плотности жизнеспособных клеток клона (Рисунок 13–А, F).

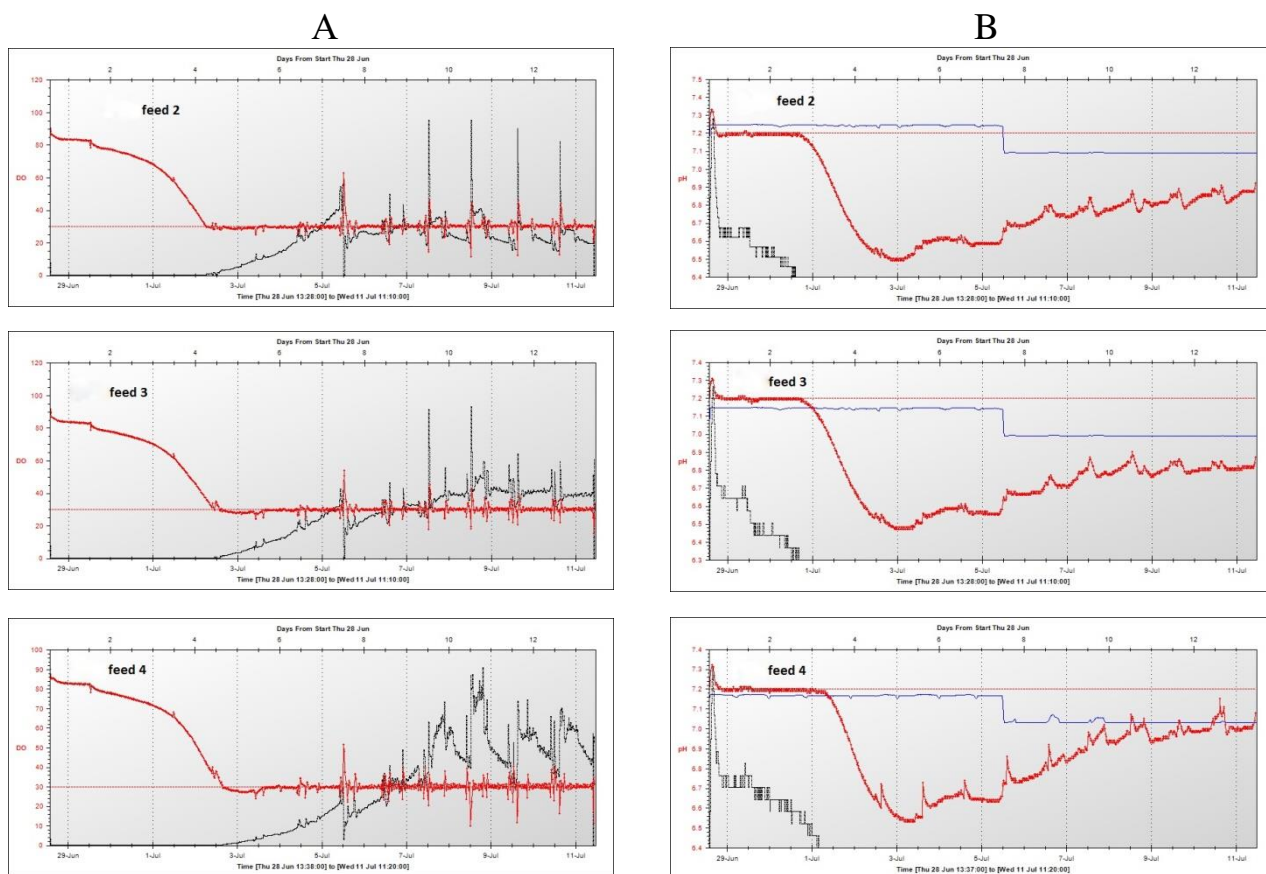


Рисунок 14. Уровень OD и pH во время культивирования на роботизированной системе минибореакторов ambr® 15 cell culture Ambr Tap Biosystems:

А – уровень DO и подачи кислорода для клона на подкормках feed 2, 3, 4.

Черным выделена подача кислорода в биореактор, красным уровень растворенного кислорода в КЖ (DO), который поддерживался автоматически не ниже 30%;

В – уровень pH и подачи CO₂ для клона на подкормках feed 2, 3, 4. Черным выделена подача CO₂ в биореактор для поддержания уровня pH (красная линия), синяя линия – температура.

В результате был подобран оптимальный компонент для подпитки клона: feed 4, который позволил увеличить экспрессию I2S на 60% до 0,5 г/л (Рисунок 13–С).

3.6 Подбор температурного режима и оптимизация добавления подкормки клона в условиях периодического культивирования

Дальнейшие эксперименты проводили для оптимизации условий подпитки и выбора температурного режима культивирования для лидерного клона–продуцента ST–5 с добавлением feed 4 в ростовую среду и ионов Cu^{2+} . Культивирование проводили в минибиореакторах ambr® 15 cell culture. Культивирование проводили в двух условиях: без снижения температуры при $+37^\circ\text{C}$ и со снижением температуры с $+37^\circ\text{C}$ на 6-е сутки до $+32^\circ\text{C}$. Схема режима подпитки представлена в таблице 10.

Снижение температуры во время культивирования клеток СНО благоприятно сказывается на продолжительности процесса культивирования, тем самым позволяя получить более высокий выход продукта [151; 152]. Со снижением температуры до $+32^\circ\text{C}$, культивирование было остановлено на 12 сутки, когда жизнеспособность клеток достигла 70% (Рисунок 15–А). Таким образом благодаря температурному сдвигу удалось достичь максимальные плотности жизнеспособных клеток культур до $5,7 \times 10^7$ клеток/мл (Рисунок 15–В) и замедлить скорость роста клеток, тем самым продлив высокую жизнеспособность культур клеток. В условиях без снижения температуры плотность жизнеспособных клеток составила от $2,0 \times 10^7$ до $3,9 \times 10^7$ клеток/мл (Рисунок 15–D). Падение жизнеспособности клеток при этом наблюдали с 7-го дня культивирования (Рисунок 15–С).

В результате эксперимента по культивированию клона в 24-х условиях наибольшую продуктивность клона ST–5 (продуцент фермента I2S) от 0,8 г/л до 1,3 г/л наблюдали при культивировании со снижением температуры до $+32^\circ\text{C}$ (Рисунок 16). Максимальный прирост продуктивности наблюдали на 12 сутки процесса культивирования (Рисунок 16–А). Для культивирования клона без снижения температуры продуктивность клона составила от 0,15 г/л до 0,32 г/л. Максимальный прирост продуктивности для данного условия наблюдали на 8–е сутки процесса культивирования (Рисунок 16–В). Лидерными условиями фидирования для культивирования без снижения температуры можно считать 14–

37 (со 2-го дня, 37°C), 21–37 (3% с 4-го дня, 37°C) и 20–37 (3% с 3-го дня, 37°C). Лидерными условиями фидирования для культивирования со снижением температуры до +32°C являются 7–32 (3% с 2-го дня, 32°C), 8–32 (3% с 3-го дня, 32°C) и 9–32 (3% с 4-го дня, 32°C).

Таблица 10 – Схема добавления подпитки во время процесса 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 зависит от удельной активности лизосомального фермента, поэтому данная характеристика белка является ключевой в разработке процесса культивирования. Продуктивность процесса культивирования со снижением температуры позволяет получить высокий выход продукта (Рисунок 17–А), однако при данном процессе культивирования клона наблюдается более низкая удельная активность этого фермента—около 15 ЕД/мкг (Рисунок 17–В). При культивировании клона без снижения температуры максимальная продуктивность составляет 0,32 г/л (Рисунок 17–А), однако при данном условии наблюдается значительное повышение удельной активности полученного I2S до 35 ЕД/мкг (Рисунок 17–В).

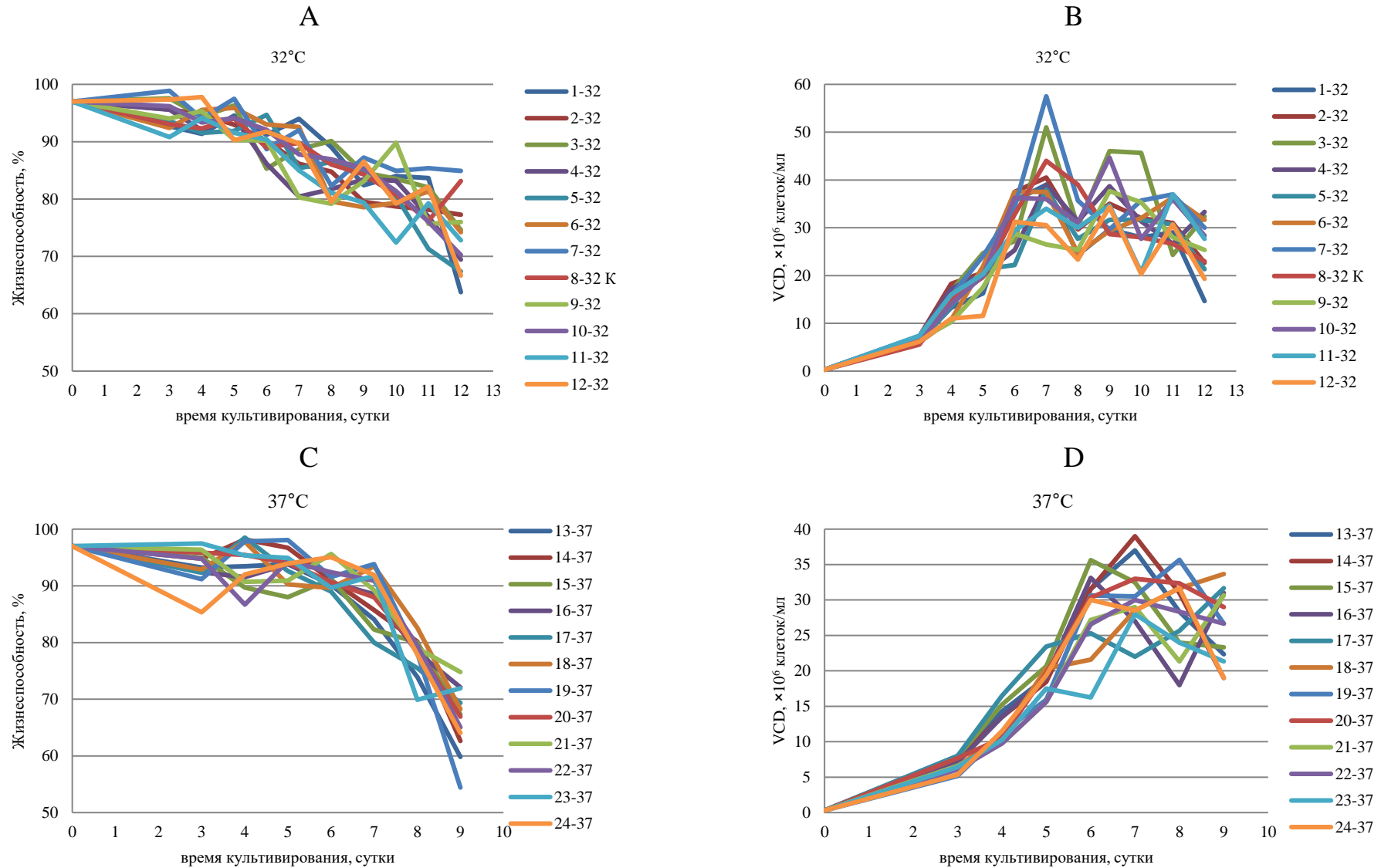


Рисунок 15. Оптимизация культивирования клон–продуцента I2S с целью выбора схемы добавления подпитки;
 А, В – жизнеспособность клонов и плотность жизнеспособных клеток со снижением температуры до 32°C;
 С, D – жизнеспособность клонов и плотность жизнеспособных клеток, 37°C; расшифровку ус. культ. смотри в табл. 10.

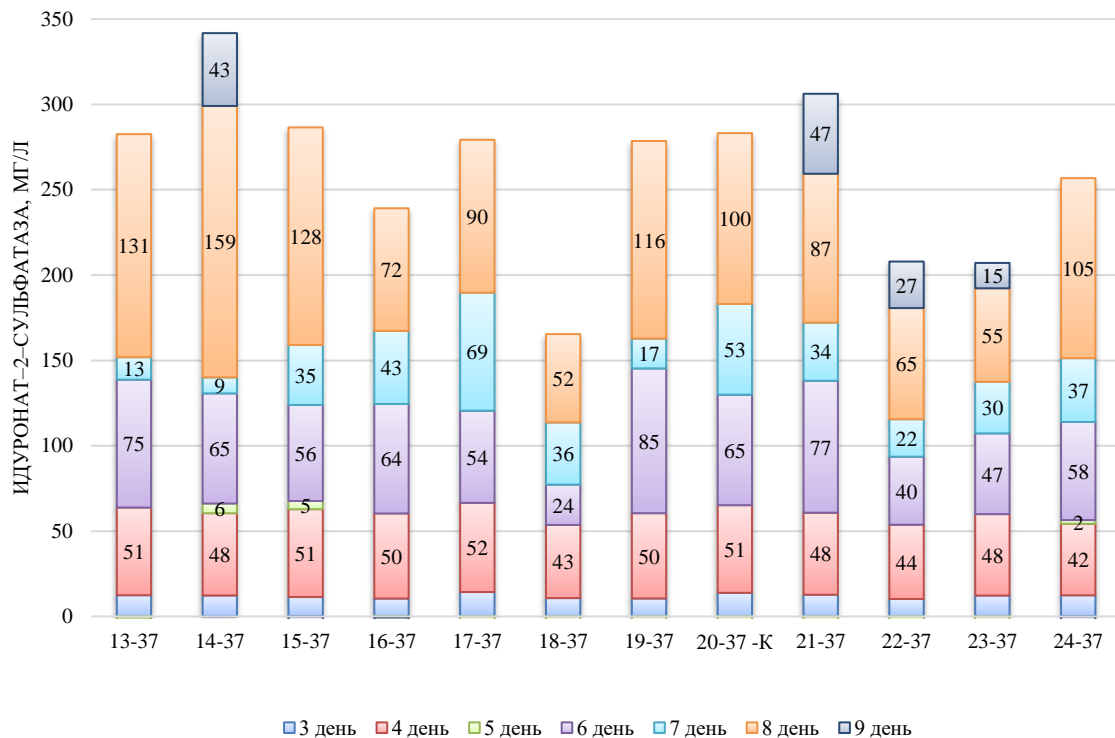
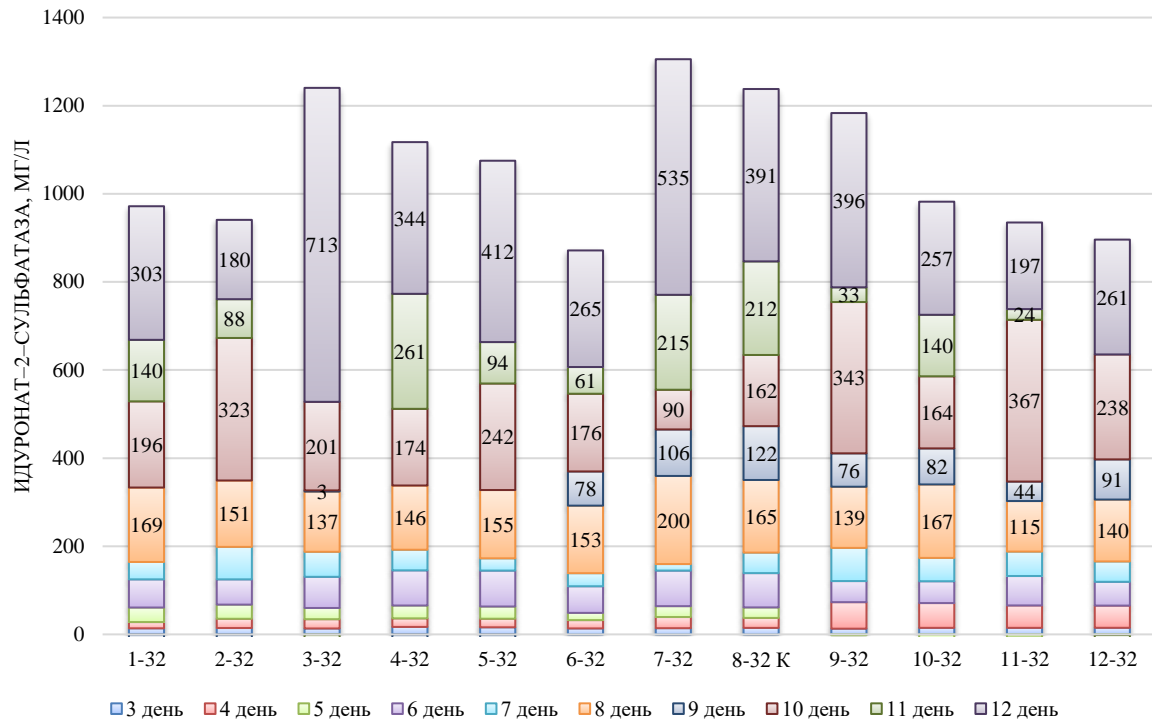


Рисунок 16. Прирост продуктивности фермента I2S по дням во время культивирования с целью выбора схемы добавления подпитки.

А – со снижением температуры до 32°C;

В – без снижения температуры;

расшифровку условий культивирования смотри в табл. 10.

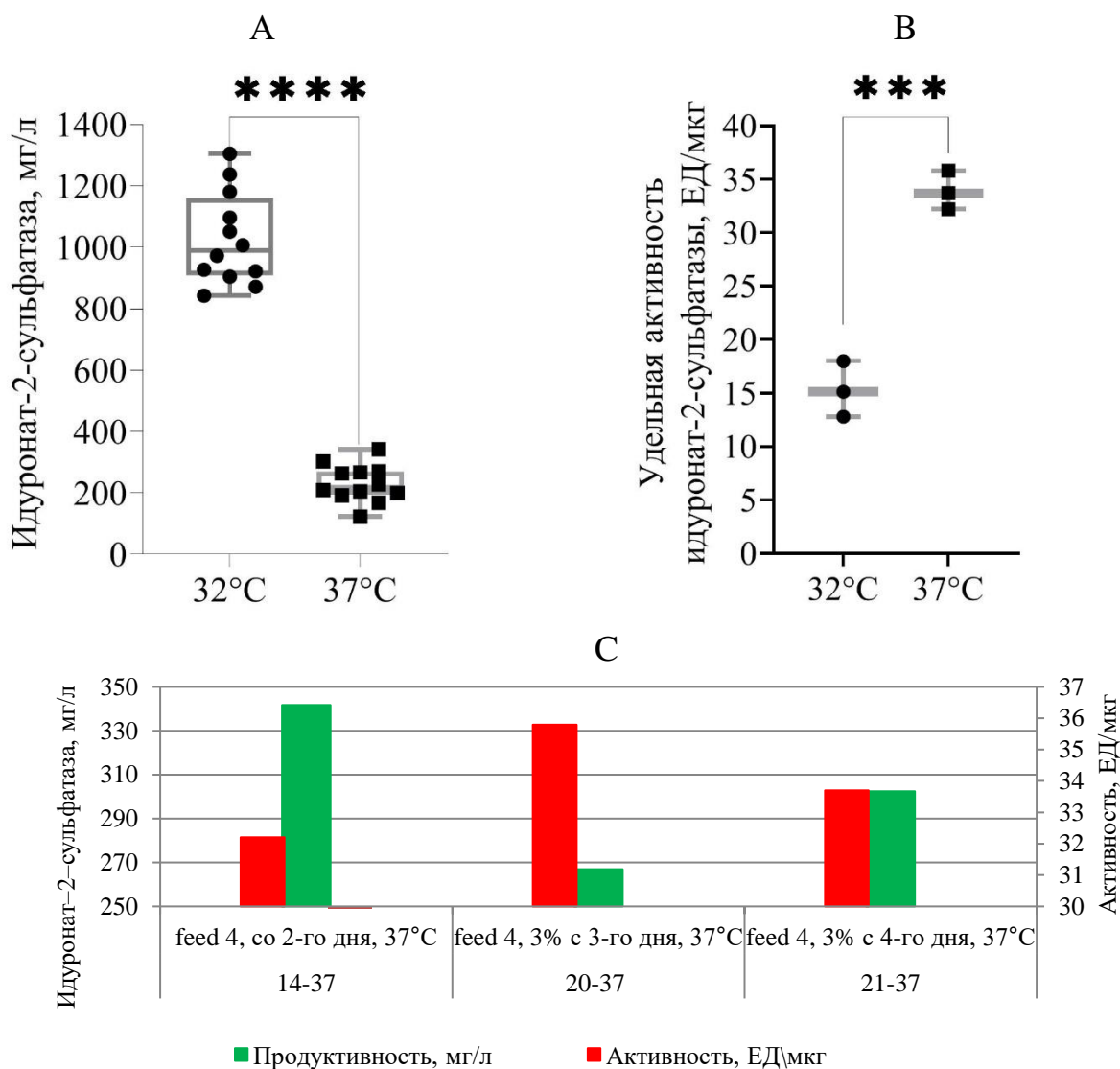


Рисунок 17. Анализ результатов продуктивности клона–продуцента в КЖ и активности очищенного целевого фермента IDS во время культивирования I2S с целью выбора схемы добавления подпитки: А – продуктивность клона, мг/л; В – удельная активность выделенного фермента IDS, ЕД/мкг; (n=12), данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения, Pvalue<0,0001. С – продуктивность и удельная активность целевого фермента IDS лидерных условий, 37°C; расшифровку условий культивирования смотри в табл. 10.

Анализируя результаты исследования по культивированию клона–продуцента I2S, можно сделать вывод, что оптимальным является культивирование без снижения температуры, при котором удельная активность фермента остается высокой.

В результате проведенного эксперимента был выбран оптимальный режим культивирования клона-продуцента I2S без снижения температуры - режим 20–37 (Таблица 10). Продуктивность клона при данных условиях – 260 мг/л, удельная активность целевого фермента – 35,8 ЕД/мкг (Рисунок 17–С), что сравнимо с биоаналогичной молекулой коммерчески доступного препарата «Элапраза» (15-35 ЕД/мкг).

Заключение по главе 3

В результате проведенных исследований на основе суспензионной клеточной линии СНО были получены высокопродуктивные моноклональные клеточные линии рекомбинантного фермента идуронат-2-сульфатазы. Продуктивность клона-продуцента составила около 300 мг/л активного фермента на 9 сутки процесса культивирования. Разработана технология культивирования клона-продуцента. Подобран компонент в качестве подпитки feed-4 и оптимизирована схема его добавления для повышения ростовых и продукционных характеристик клеточной культуры. Добавление в ростовую среду 300 мкМ сульфата меди во время непрерывного культивирования позволило увеличить удельную активность целевого фермента до 30-35 ЕД/мкг, что сопоставимо с рекомбинантным коммерчески доступным препаратом идурсульфазы «Элапраза».

Полученные клеточные линии-продуценты могут быть использованы в дальнейшей разработке технологии производства лекарственного препарата на основе рекомбинантной идуронат-2-сульфатазы для ферментозаместительной терапии мукополисахаридоза II типа.

По результатам данных экспериментов опубликована статья:

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.

ГЛАВА 4. ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА АРИЛСУЛЬФАТАЗЫ В

4.1 Трансфекция клеток CHO плазмидой, содержащей ген ARSB

Трансфекцию проводили с помощью электропорации на приборе Max Cyte (STX) в кювете ОС-100. Клетки CHO рассеивали в плотности $0,3 \times 10^6$ клеток/мл за сутки до трансфекции. Использовали линейризованную плазмиду pGNR-ASB, кодирующую целевой фермент ASB. Через 24 и 48 часов после электропорации определяли жизнеспособность и плотность жизнеспособных клеток (Таблица 11). Также была проведена контрольная трансфекция клеток CHO без использования плазмиды, для выявления влияния процесса электропорации на жизнеспособность клеток данной линии (Таблица 11, 12).

Таблица 11 – Условия трансфекции клеток CHO плазмидой, содержащей ген IDS

Плазида	Селективный маркер	Буфер R, мкл	Клеток CHO, 10^6 клеток
pGNR-ASB	неомицин	100 μ l	20
Контроль, без плазмиды	–	40	0,5

Таблица 12 – Жизнеспособность клеточных пулов после электропорации клеток CHO плазмидой, содержащей ген ASB

Плазида	ОС-100	Время после трансфекции, ч			
		24		48	
		VCD, mln/ml	Viability, %	VCD, mln/ml	Viability, %
pGNR-ASB	1	0,8	95	1,2	98
	2	1,1	87	1,5	95
	3	0,95	93	1,4	94
Контроль	9	0,33	92	1,11	86

4.2 Получение минипулов–продуцентов рекомбинантного лизосомального фермента арилсульфатазы В

Рассев на минипулы в селективную среду (BCD с 600 мкг/мл неомицина) на 10-ть 96-ти луночных планшетов был проведен через 48 ч после трансфекции. Планшеты инкубировали в стационарных условиях в CO₂ инкубаторе в течение 12 суток. В результате серии скринингов методом дот-блоттинга на наличие ASB, были отобраны лидерные минипулы и перенесены в TubeSpin Bioreactor для суспензионного культивирования (Рисунок 18). Культивирование 24-х лидерных минипулов в режиме batch проводили с целью отбора наиболее перспективных по продуктивности и ростовым характеристикам.

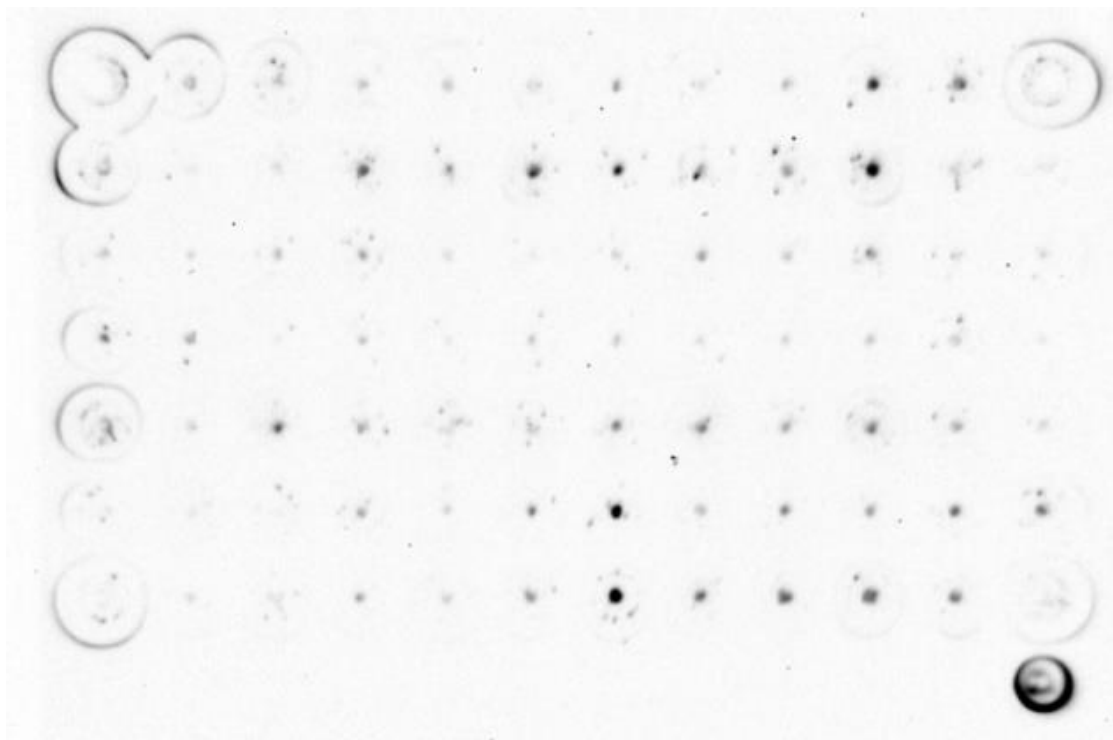


Рисунок 18. Анализ продуктивности клонов ASB методом дот-блоттинга во время скрининга 96-ти луночных планшетов. Стандарт – Галсульфаза («Naglazyme», Biomarin), 500 нг/лунка, снизу справа.

Снижение жизнеспособности минипулов-продуцентов наблюдали на 6-е сутки культивирования. Жизнеспособность выше 80% на 6-е сутки культивирования наблюдали для клонов Gal-12, Gal-6, Gal-18, Gal-19, Gal-8, Gal-9, Gal-13, Gal-10, Gal-1, Gal-20, Gal-2 (Рисунок 19–А). Максимальную плотность жизнеспособных клеток минипулов наблюдали на 5-е и 6-е сутки культивирования.

Плотность клеток выше $2,0 \times 10^7$ клеток/мл наблюдали у минипулов: Gal-17, Gal-5, Gal-3, Gal-16, Gal-11, Gal-4, Gal-9, Gal-15, Gal-10, Gal-8, Gal-22, Gal-21, Gal-14, Gal-1, Gal-18 (Рисунок 19–В). Динамика накопления лизосомального фермента ASB в КЖ минипулов представлена на Рисунке 6. Максимальная продуктивность составила около 1 мг/л. Минипулы с продуктивностью выше 1 мг/л: Gal-23, Gal-5, Gal-7. Минипулы с продуктивностью от 0,5 мг/л до 1 мг/л: Gal-20, Gal-24, Gal-17, Gal-15, Gal-11, Gal-2, Gal-16, Gal-3, Gal-21, Gal-9, Gal-22, Gal-1.

Зависимость продуктивности минипулов ASB от кумулятивной клеточной плотности позволяет выявить минипулы с максимальной продуктивностью и высокой плотностью жизнеспособных клеток в суспензии. Минипулы: Gal-23, Gal-5 и Gal-7 были отмечены как способные достигать высоких клеточных плотностей с максимальным выходом белка (Рисунок 19–D).

В результате работы была получена панель минипулов-продуцентов рекомбинантного лизосомального фермента ASB. Был создан исследовательский банк клеток минипулов продуцентов ASB на основе CHO. Минипул-продуцент ASB Gal-23 был выбран для дальнейших экспериментов.

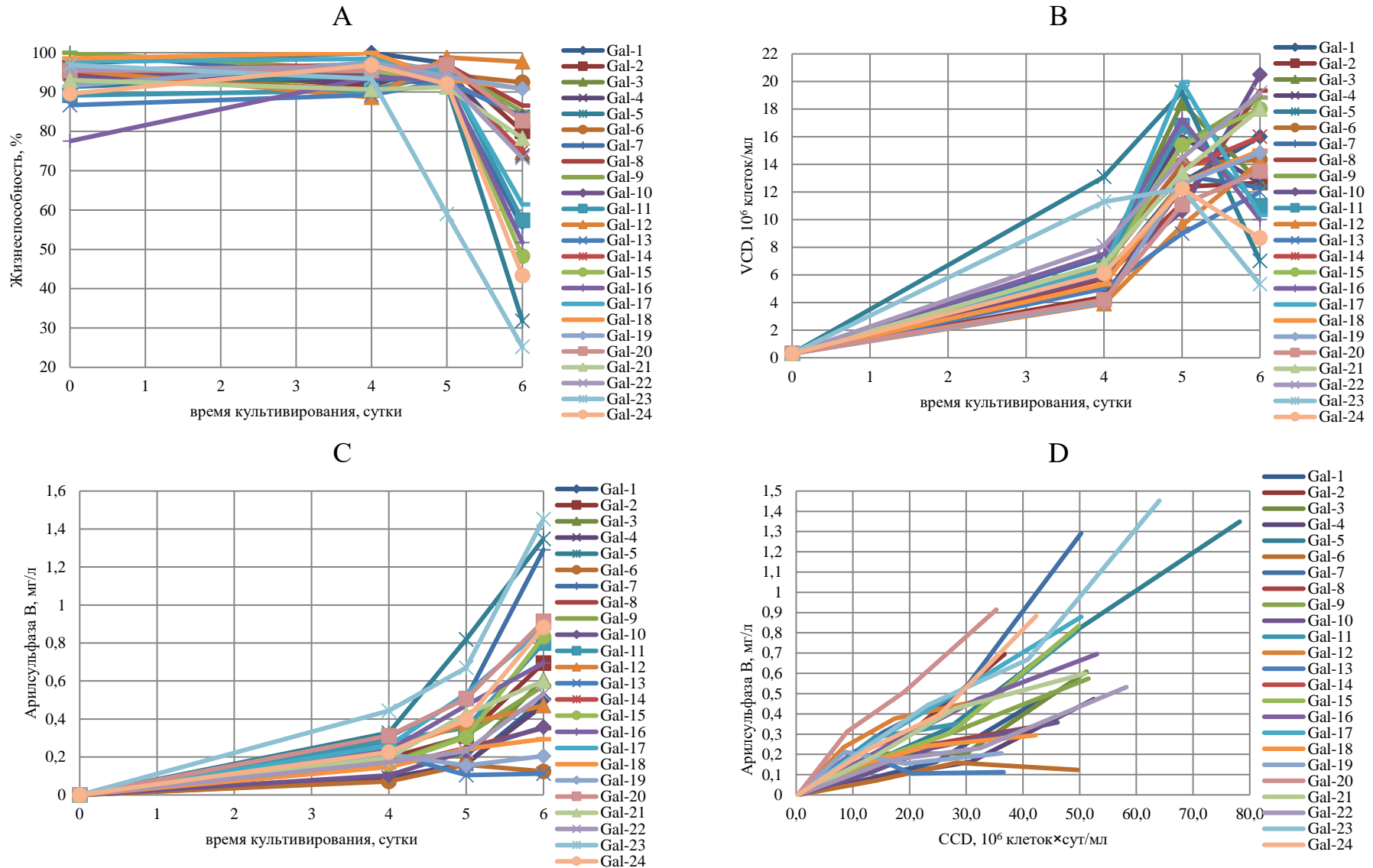


Рисунок 19. Периодическое культивирование 24-х миниулов-продуцентов ASB. А – жизнеспособность; В – плотность жизнеспособных клеток; С – волюметрическая продуктивность; Д – зависимость кумулятивной клеточной плотности от продуктивности.

4.3 Получение клонов-продуцентов рекомбинантного лизосомального фермента арилсульфатазы В

Минипул–продуцент ASB Gal-23 был клонирован методом предельного разведения с подтверждением моноклональности полученных клонов на высококонтрастной фотодокументирующей системе Solentim Cell Metric, предназначенной для визуализации единичных клеток, идентификации и характеристики моноклонального роста клеточных линий. В результате последующих скринингов клонов 96-луночных и 6-луночных планшетов были отобраны около 20 лидерных клонов, для которых была подтверждена моноклональность на фотодокументирующей системе Solentim Cell Metric и переведены на шейкерное культивирование. Ниже приведены данные подтверждения моноклональности для выбранного для дальнейшей работы клон–продуцента ASB (Рисунок 20). На рисунке 20 можно наблюдать рост моноклональной клеточной линии клон–продуцента ASB: одиночная клетка в нулевой день клонирования, две клетки на следующие сутки после клонирования, четыре клетки на 48 часов роста колонии и т. д.

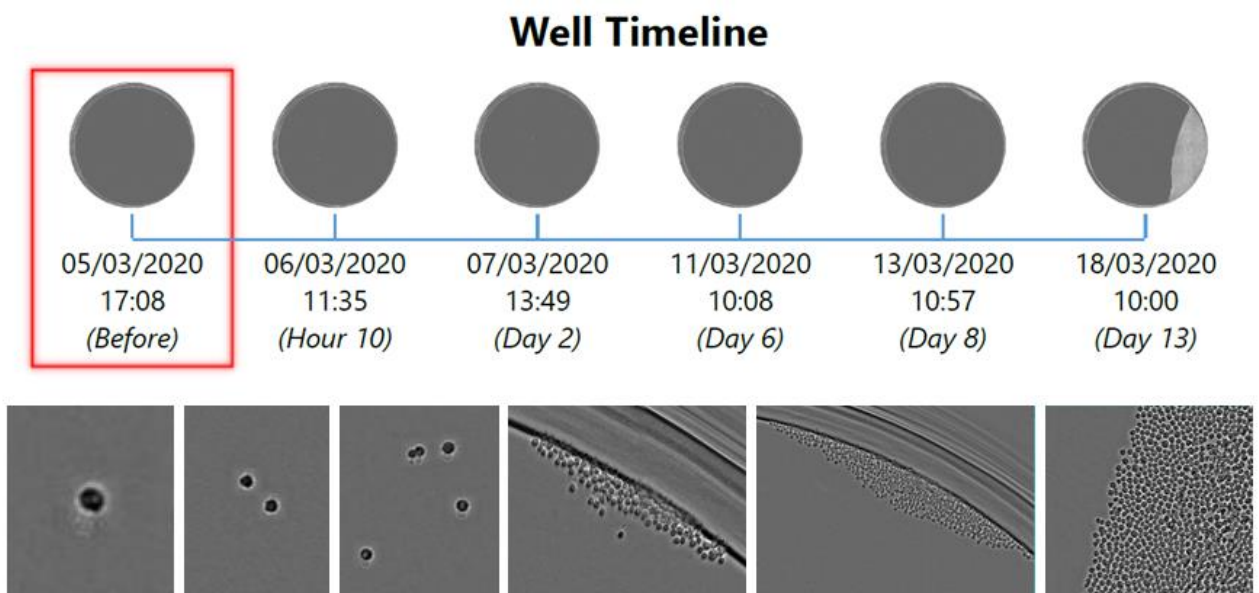


Рисунок 20. Фотодокументация роста моноклональной клеточной линии–продуцента ASB с использованием системы Cell Metric (Solentim).

4.4 Изучение влияния добавления сульфата меди и хлорида кальция на продуктивность, ростовые характеристики и метаболизм клона-продуцента рекомбинантного лизосомального фермента арилсульфатазы В

В литературе описано несколько механизмов реакции конверсии Cys в fGly в активном центре фермента ASB под действием FGE: с использованием молекулярного кислорода или с помощью иона Cu^{2+} [84; 85; 153; 154]. Также, в структуре фермента ASB было показано наличие ионов Ca^{2+} и Cl^- [17; 71; 77; 78]. Следует отметить, что вспомогательный фермент FGE также имеет два иона Ca^{2+} в составе третичной структуры белка. Для изучения влияния ионов металлов на ростовые и продукционные характеристики клеточной линии проводили культивирование полученного клона-продуцента ASB в трех условиях: в стандартной ростовой среде (контроль); с добавлением 300 мкМ сульфата меди и одновременным добавлением 300 мкМ сульфата меди и 300 мкМ хлорида кальция.

Изменений ростовых характеристик клона в зависимости от условий культивирования не наблюдали. Жизнеспособность клеток клона снижалась на 7-е сутки процесса (Рисунок 21–А). Максимальная клеточная плотность на 6-е сутки культивирования достигала около $1,5 \times 10^7$ клеток/мл (Рисунок 21–В). Уровень глюкозы и лактата представлен на рисунке 17–С, D.

Несмотря на схожие ростовые характеристики клона-продуцента ASB в разных условиях культивирования, было выявлено 3-х кратное увеличение его продуктивности с 2 до 6 мг/л и повышение специфической продуктивности с 0,04 до 0,12 пг/клетка/сут при добавлении в ростовую среду сульфата меди (Рисунок 21–Е, F). Добавление хлорида кальция в ростовую среду для культивирования продуцента ASB не влияло на его ростовые или продукционные характеристики (Рисунок 21–А–F). Активность ASB в КЖ была в 1,5 раза выше при культивировании клеток в среде с добавлением сульфата меди, и в 2,5 раза выше при добавлении сульфата меди и хлорида кальция, в сравнении со стандартной средой (Рисунок 21–G). 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 [18, 16, 12, 85].

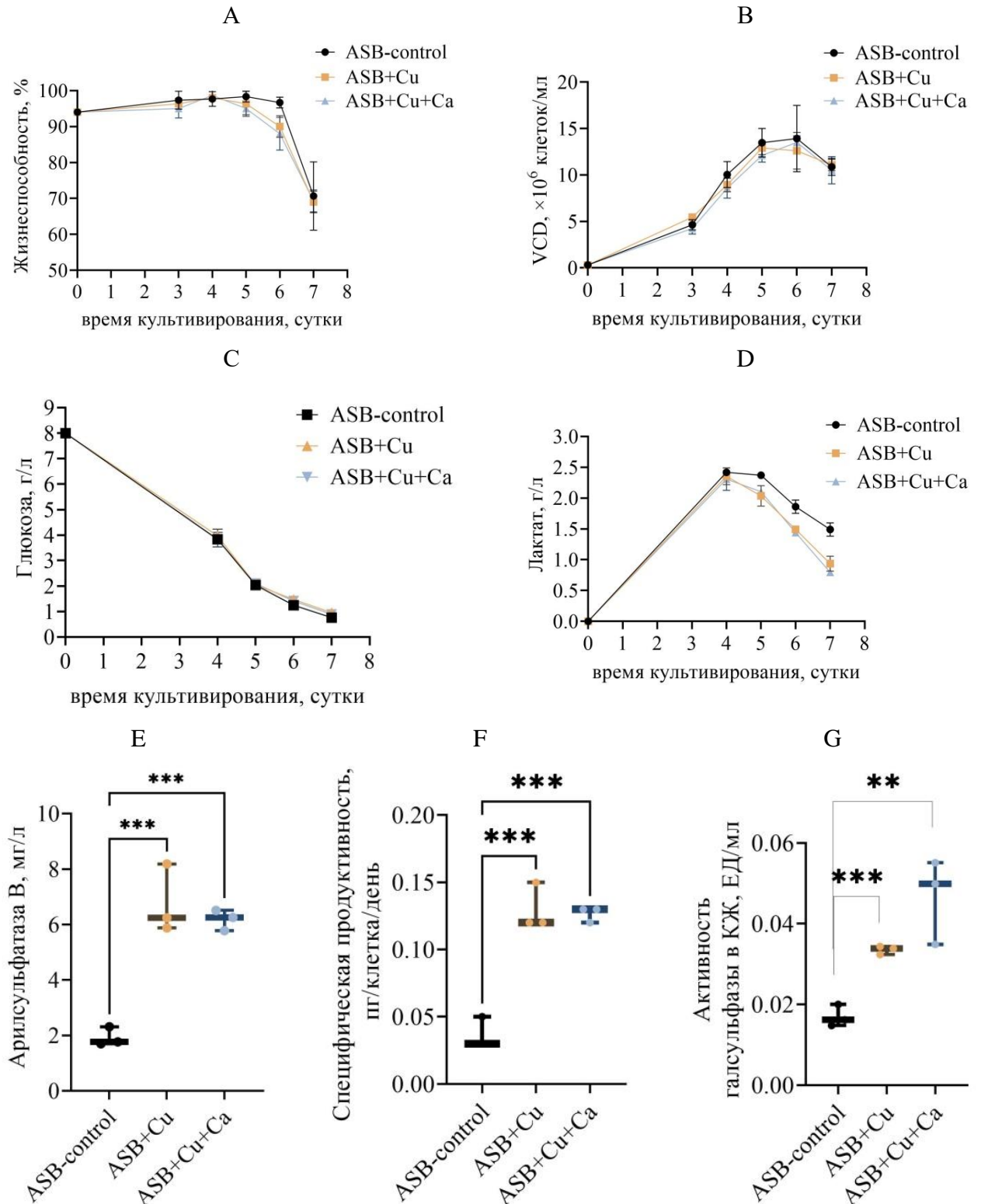


Рисунок 21. Характеристики клона–производителя ASB в процессе периодического культивирования. А – жизнеспособность клеток, %; В – плотность жизнеспособных клеток, 10^6 клеток/мл; С – уровень глюкозы в КЖ, г/л; D – уровень лактата в КЖ, г/л. Е – волюметрическая продуктивность, мг/л; F – удельная продуктивность клеток, пг/клетка/сут;

G – 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).

4.5 Увеличение продуктивности клон-продуцента арилсульфатазы В за счет коэкспрессии вспомогательного формилглицин генерирующего фермента

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

Плотность жизнеспособных клеток и жизнеспособность продуцентов ASB и ASB+FGE в ходе сравнительного культивирования была схожей (Рисунок 22–А, В), при этом наблюдали значительное увеличение как волюметрической, так и специфической продуктивности клеток ASB+FGE (Рисунок 22–С, D). По результатам ИФА, продуктивность клон ASB составила 3–5 мг/л, а продуктивность продуцента ASB+FGE – 25 мг/л (Рисунок 22–С). Увеличение продуктивности клеток ASB+FGE было также подтверждено вестерн–блот анализом образцов КЖ (Рисунок 22 F–G).

По литературным данным известно, что белок FGE локализован в эндоплазматическом ретикулуме [24], где участвует в трансформации активного центра сульфатазы, поэтому для подтверждения экспрессии экзогенного FGE у клон–продуцента ASB+FGE, проводили вестерн–блот анализ клеточных лизатов (Рисунок 22–H, I). Уровень эндогенного FGE у нетрансфицированных клеток был ниже предела детекции (Рисунок 22–H, треки 2–4), специфическое окрашивание экзогенного FGE подтверждает тот факт, что коэкспрессия двух ферментов

приводит к повышению продуктивности клеточной линии (Рисунок 22–Н, 22–Г, треки 5–7).

Для оценки влияния экспрессии экзогенного FGE на уровень мРНК гена ASB была проведена количественная ПЦР в реальном времени (qPCR) (Рисунок 22–Е). 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 КЖ у этих клеточных линий отличается значительно (Рисунок 22–С).

При совокупности полученных экспериментальных данных можно предположить механизм повышения экспрессии ASB за счет коэкспрессии вспомогательного белка FGE. Сверхэкспрессированный 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 экзогенного FGE в клетках CHO значительно повышает количество модифицированного ASB, способного пройти через секреторный аппарат клеток в КЖ.

Таким образом, с помощью коэкспрессии вспомогательного белка FGE, участвующего в критической трансформации активного центра ASB, удалось увеличить продуктивность клеточной линии целевого фермента с 2-3 мг/л до 26-28 мг/л.

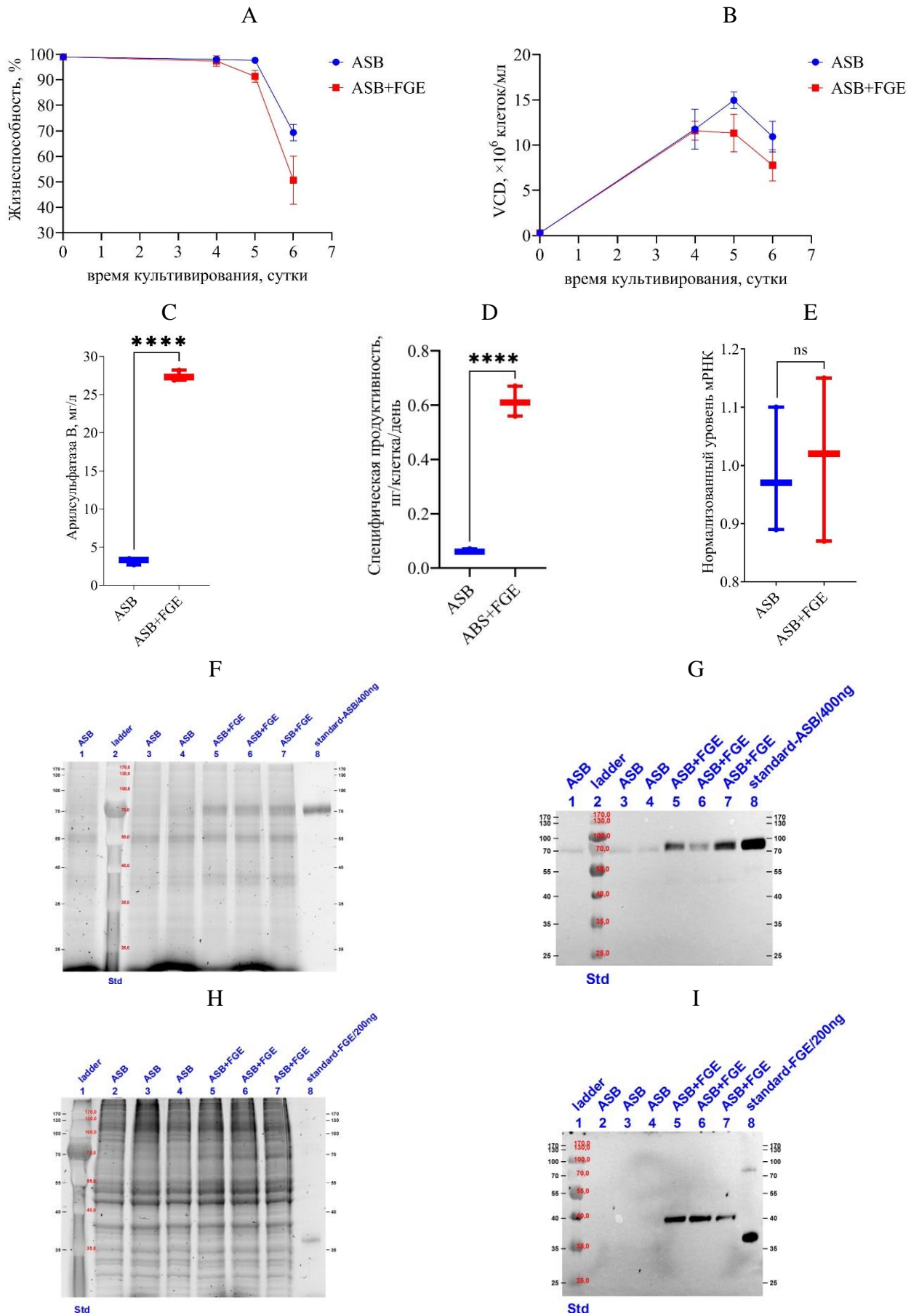


Рисунок 22. Характеристики клона-продуцента ASB после супертрансфекции геном SUMF1; А – жизнеспособность клеток, %; В – плотность жизнеспособных

клеток, 10^6 клеток/мл; С – продуктивность клеток, мг/л; D – удельная продуктивность клеток, пг/клетка/сут; E – электрофорез КЖ, 20 мкл/трек; F – вестерн-блот анализ КЖ, антитела anti-ASB (АО «Генериум», РФ); G – электрофорез лизатов, 2×10^5 клеток/трек; H – 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–производитель ASB; ASB+FGE–клон ASB после супертрансфекции геном SUMF1; $n=3$, данные представлены в виде среднего значения и \pm SEM ($n=3$). Pvalue_s рассчитывали с помощью One-Way ANOVA (*Pvalue_s < 0.05, **Pvalue_s < 0.01, ***Pvalue_s < 0.001, ****Pvalue_s < 0.0001).

Заключение по главе 4

В результате проведенных исследований были получены моноклональные клеточные линии рекомбинантного фермента арилсульфатазы В на основе суспензионной клеточной линии CHO. Показано, что добавление в ростовую среду сульфата меди положительно влияет на продуцентов арилсульфатазы В, значительно повышая выход целевого фермента. Проведена котрансфекция клеточных линий-продуцентов арилсульфатазы В генетической конструкцией, кодирующей формилглицин генерирующий фермент. Показано что коэкспрессия формилглицин генерирующего фермента значительно повышает продуктивность клеточных линий-продуцентов арилсульфатазы В.

По совокупности полученных экспериментальных данных можно предположить, что улучшение продукционных свойств клеточной линии при коэкспрессии арилсульфатазы В и формилглицин генерирующего фермента обусловлено, модификацией активного центра целевого фермента арилсульфатазы В, катализируемой вспомогательным формилглицин генерирующим ферментом, что обеспечивает правильный фолдинг, стабильную конфигурацию и функциональную активность арилсульфатазы В.

Полученные результаты позволят решить проблему низкого выхода рекомбинантной лизосомальной сульфатазы и будут способствовать разработке высокопродуктивной клеточной линии-продуцента фермента арилсульфатазы В.

**ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ
МОНОКЛОНАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ,
КОЭКСПРЕССИРУЮЩИХ АРИЛСУЛЬФАТАЗУ В И ФОРМИЛГЛИЦИН
ГЕНЕРИРУЮЩИЙ ФЕРМЕНТЫ И ТЕХНОЛОГИИ ИХ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДЛЯ ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА
РЕКОМБИНАНТНОГО АКТИВНОГО ФЕРМЕНТА АРИСУЛЬФАТАЗЫ В**

5.1 Котрансфекция клеток CHO плазмидами с генами ARSB и SUMF1

Для получения высокопродуктивных клеточных линий для производства лекарственного препарата на основе ASB, была проведена ко–трансфекция родительской клеточной линии CHO в различных вариантах. В первом варианте (контроль) использовали одну плазмиду с целевым геном фермента ARSB. В других вариантах ко–трансфекцию проводили с использованием разных соотношений двух плазмид, кодирующих гены ARSB и SUMF1 (Таблица 13).

Таблица 13 – Варианты трансфекции. Соотношение плазмид с генами ARSB и SUMF1.

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%

Наиболее значительное увеличение выхода целевого фермента наблюдали у минипулов, полученных при соотношении плазмид при трансфекции ASB 90% и FGE 10% (Таблица 13, Рисунок 23).

5.2 Получение минипулов–продуцентов коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин генерирующий фермент

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 (Рисунок 23–А, $p_{\text{values}} < 0.0001$).

После перевода тридцати минипулов в условия суспензионного шейкерного культивирования проводили периодическое культивирование течение 6 суток для оценки их роста и продуктивности (Рисунок 24). Минипулы ASB имели продуктивность до 10 мг/л, минипулы, коэкспрессирующие ASB+FGE имели продуктивность до 100 мг/л (Рисунок 23–В). В результате эксперимента наблюдали увеличение продуктивности ASB у минипулов с увеличением доли плазмиды, несущей ген целевого фермента (Рисунок 23–А–В).

Электрофоретическую подвижность ASB в КЖ лидерных минипулов оценивали с помощью электрофореза в денатурирующих восстанавливающих условиях и вестерн–блот анализа (Рисунок 25). Электрофоретическая подвижность ASB в образцах КЖ была сопоставимой с ASB коммерчески доступного препарата «Наглазим» (BioMarin, США) (Рисунок 25–А–D, трек 10, E–H, треки 9–10). Аналогично результатам ИФА, при вестерн–блот анализе также наблюдали высокую продуктивность у минипулов ASB+FGE (Рисунок 23–А–F) и слабый специфический сигнал у минипулов, экспрессирующих только ASB, без вспомогательного белка (Рисунок 25–G–H, треки 5–8).

Для получения высокопродуктивных моноклональных клеточных линий лидерный минипул–продуцент ASB+FGE был клонирован с помощью роботизированной системы Clone Pix.

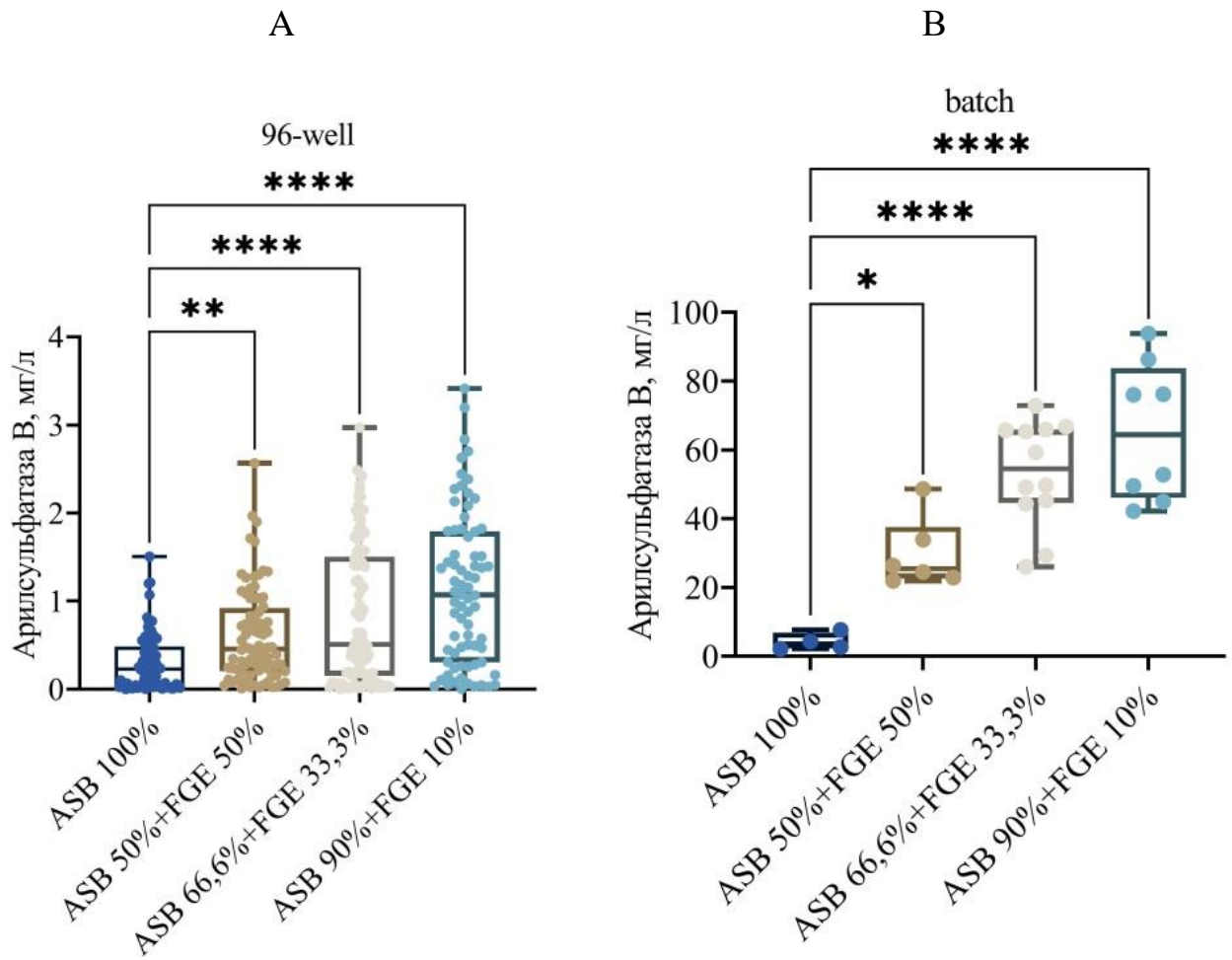


Рисунок 23. Продуктивность минипулов в зависимости от разного соотношения плазмид с генами, кодирующими ASB и FGE;

А – продуктивность во время скрининга 96–луночных планшетов, мг/л;

В – волюметрическая продуктивность в условиях периодического культивирования 6 суток, мг/л; ASB+FGE – минипулы, трансфицированные двумя плазмидами, несущими гены ARSB и SUMF1; ASB – минипулы, трансфицированные одной плазмидой, несущей ген ARSB.

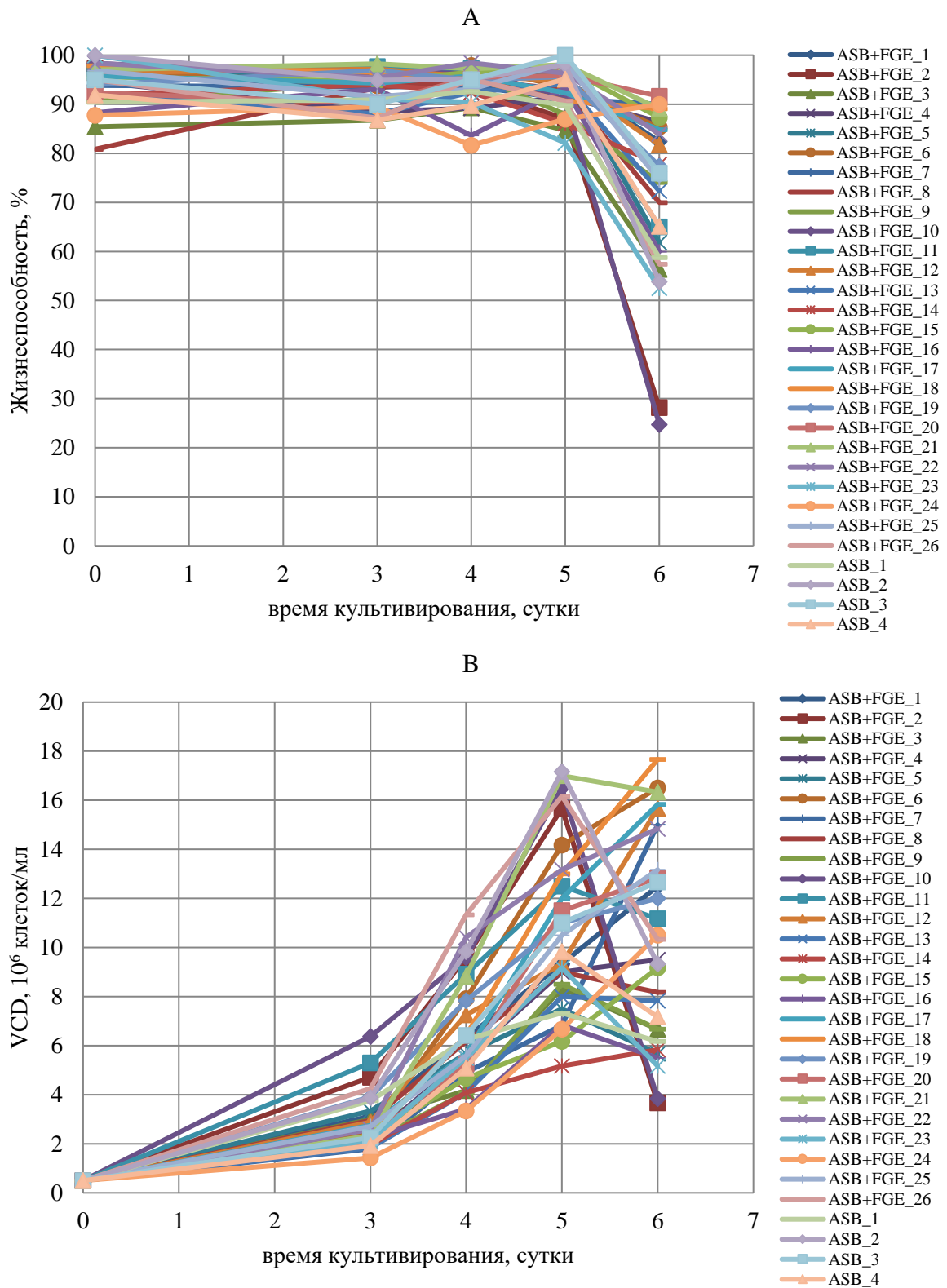


Рисунок 24. Ростовые характеристики минипулов–продуцентов ASB; А – жизнеспособность минипулов, %; В – плотность жизнеспособных клеток, 10^6 клеток/мл; ASB+FGE – минипулы, трансфицированные двумя плазмидами, несущими гены ARSB и SUMF1; ASB – минипулы, трансфицированные одной плазмидой, несущей ген ARSB.

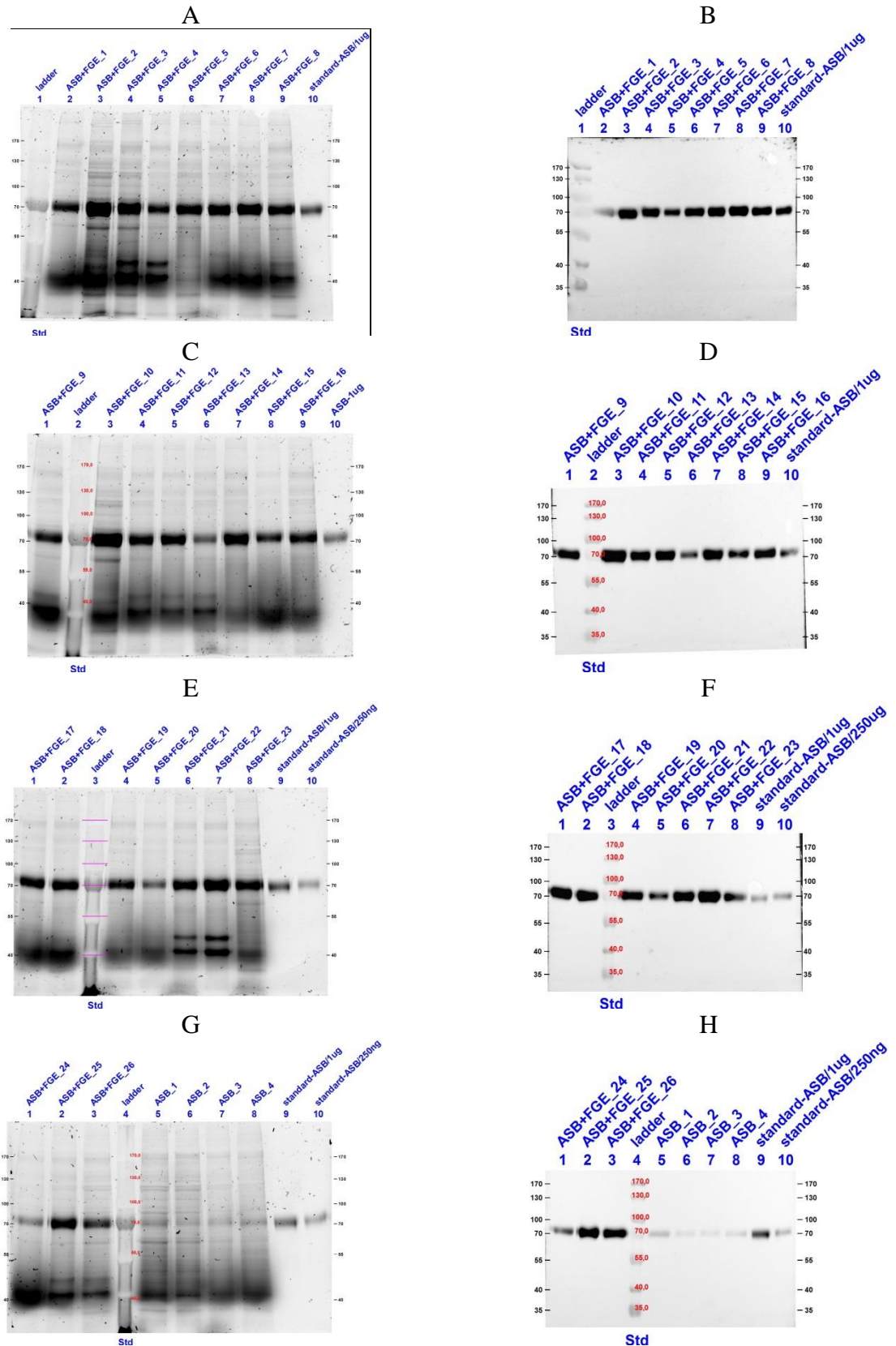


Рисунок 25. Электрофорез и вестерн-блот анализ КЖ минипулов–продукторов ASB. А, С, Е, G – электрофорез КЖ минипулов–продукторов ASB, 20 мкл/трек; В, D, F, H – вестерн-блот анализ КЖ, антитела anti–ASB (АО «Генериум, РФ); standard ASB – рекомбинантный ASB (Наглазим, BioMarin). ASB+FGE–минипулы, трансфицированные двумя плазмидами, несущими гены ARSB и SUMF1; ASB – минипулы, трансфицированные одной плазмидой, несущей ген ARSB.

5.3 Получение клонов–продуцентов коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин генерирующий фермент

Клоны–продуценты ASB+FGE были получены с помощью системы отбора колоний Clone Pix. В результате работы было использовано несколько раундов отбора клонов, что позволило получить около 500 клонов–продуцентов ASB+FGE. После проведения скринингов 96–ти и 6–ти луночных планшетов для поиска клонов с высокой продуктивностью (Рисунок 26), были отобраны 20 клонов и переведены на шейкерное культивирование. Был создан исследовательский криобанк клеток клонов–продуцентов ASB+FGE на раннем пассаже.

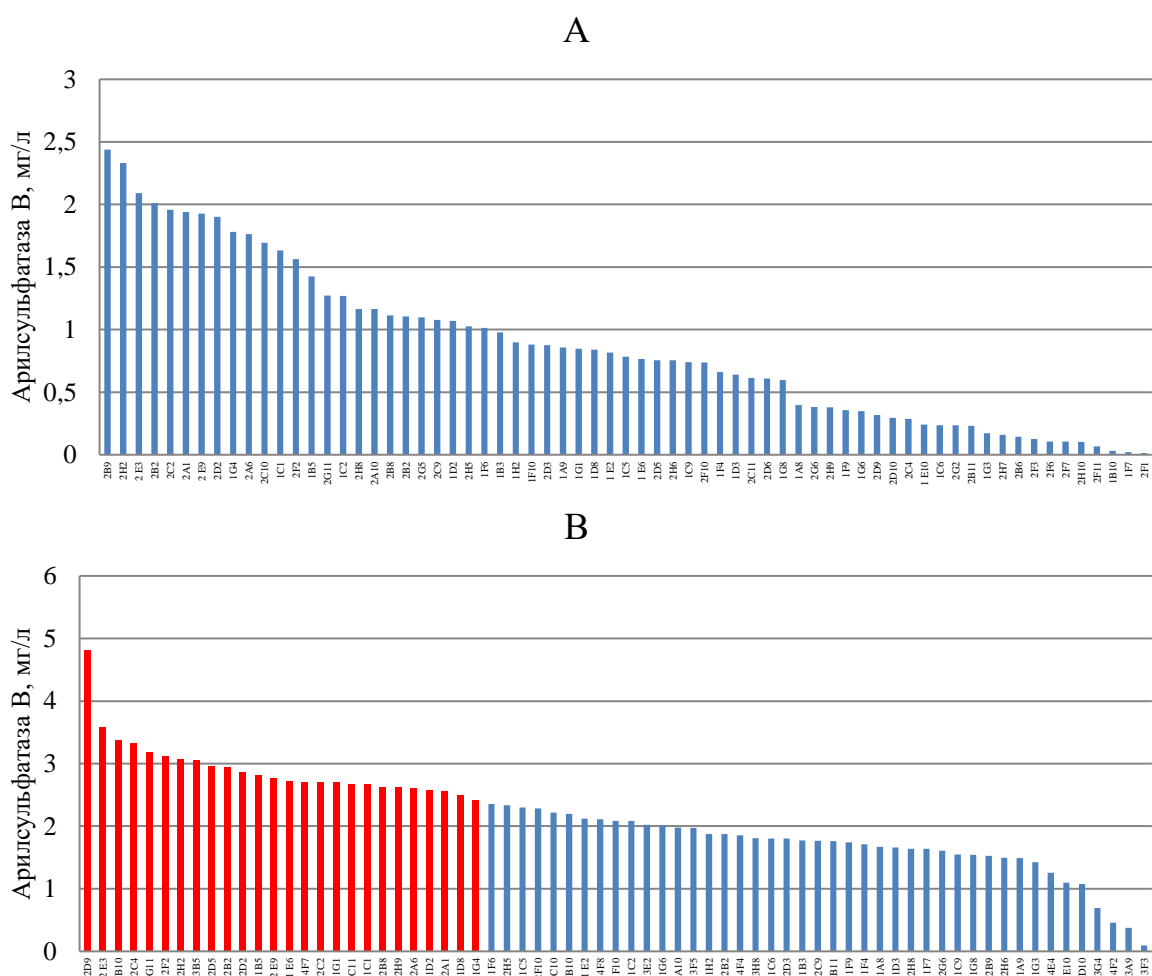


Рисунок 26. Распределение клонов по продуктивности во время скрининга методом ИФА: А–96–ти луночных планшетов, мг/л; В–6–ти луночных планшетов, мг/л.

Красным отмечены клоны, отобранные для дальнейшей работы.

Периодическое культивирование лидерных клонов в течение 6 суток было проведено после восстановления ими ростовых характеристик в условиях

шейкерного культивирования. В таблице 14 и на рисунке 27 представлены результаты проведенного эксперимента.

Плотности жизнеспособных клеток более 15×10^6 клеток/мл наблюдали для клонов: Clone ASB+FGE_6 и Clone ASB+FGE_20 на 6 сутки культивирования; и Clone ASB+FGE_1, Clone ASB+FGE_9, Clone ASB+FGE_17, Clone ASB+FGE_7, Clone ASB+FGE_18 на 5 сутки культивирования процесса (Рисунок 27–А). Высокую жизнеспособность клеток на 6 сутки культивирования наблюдали у клонов: Clone ASB+FGE_6, Clone ASB+FGE_20, Clone ASB+FGE_4, Clone ASB+FGE_16, Clone ASB+FGE_19 (Рисунок 27–В). В результате исследования были получены клоны со специфической продуктивностью более 1,5 пг/клетка/сут: Clone ASB+FGE_11, Clone ASB+FGE_16, Clone ASB+FGE_2, Clone ASB+FGE_8, Clone ASB+FGE_4, Clone ASB+FGE_5 (Таблица 14). На 6 сутки культивирования было выявлено девять клонов с продуктивностью более 40 мг/л целевого фермента в КЖ: Clone ASB+FGE_16, Clone ASB+FGE_1, Clone ASB+FGE_2, Clone ASB+FGE_11, Clone ASB+FGE_3, Clone ASB+FGE_4, Clone ASB+FGE_8, Clone ASB+FGE_17 (Рисунок 27–D).

В результате проделанной работы были получены клоны–продуценты коэкспрессирующие ферменты ASB+FGE. Для дальнейших экспериментов были выбраны 8 лидерных клонов с высоким выходом целевого фермента ASB: Clone ASB+FGE_1, Clone ASB+FGE_2, Clone ASB+FGE_3, Clone ASB+FGE_4, Clone ASB+FGE_8, Clone ASB+FGE_9, Clone ASB+FGE_11, Clone ASB+FGE_16 (Рисунок 27–С).

Таблица 14 – Результаты периодического культивирования в течение 6 суток клонов–продуцентов ASB+FGE, содержащих ген SUMF1.

Название клона	VCD, 10 ⁶ клеток/мл			Жизнеспособность, %			Продуктивность, мг/л			Удельная продуктивность, пг/клетка/сут		
	время культивирования, сутки											
	4	5	6	4	5	6	4	5	6	4	5	6
Clone ASB+FGE_1	11,1	21,2	5,0	99	95	38	25,7	40,5	53,4	1,1	1,0	1,0
Clone ASB+FGE_2	9,8	14,7	9,2	98	86	40	41,0	48,8	52,3	2,0	1,5	1,2
Clone ASB+FGE_3	7,6	13,7	11,0	95	98	60	19,2	29,6	44,0	1,2	1,1	1,1
Clone ASB+FGE_4	6,7	14,2	13,8	94	99	80	33,7	33,9	42,0	2,4	1,4	1,1
Clone ASB+FGE_5	8,7	12,3	6,0	99	86	36	31,5	32,1	32,8	1,8	1,1	0,9
Clone ASB+FGE_6	3,5	12,7	19,2	99	93	98	7,4	14,8	24,2	1,0	0,9	0,8
Clone ASB+FGE_7	10,1	16,2	11,3	99	97	54	25,5	32,5	36,3	1,2	1,0	0,8
Clone ASB+FGE_8	9,8	10,5	3,1	94	83	29	34,0	36,1	41,4	1,7	1,2	1,1
Clone ASB+FGE_9	9,6	17,2	8,3	99	87	45	16,5	32,8	41,6	0,8	1,0	0,9
Clone ASB+FGE_10	10,6	14,8	3,3	98	93	27	10,0	20,4	27,8	0,5	0,6	0,6
Clone ASB+FGE_11	4,8	6,3	6,5	92	93	53	20,4	36,6	46,5	2,0	2,3	2,1
Clone ASB+FGE_12	9,8	14,7	5,2	94	96	52	19,2	32,7	36,6	0,9	1,0	0,9
Clone ASB+FGE_13	7,0	14,5	11,3	98	96	44	9,4	23,0	30,0	0,6	0,9	0,8
Clone ASB+FGE_14	8,3	13,0	12,3	95	92	55	15,7	28,4	32,1	0,9	1,0	0,8
Clone ASB+FGE_15	7,1	11,5	7,7	99	87	56	16,4	35,3	37,0	1,1	1,5	1,1
Clone ASB+FGE_16	4,8	13,3	11,9	98	99	78	13,9	37,0	54,8	1,4	1,9	1,7
Clone ASB+FGE_17	9,7	16,3	10,0	98	96	41	11,4	30,0	40,1	0,6	0,9	0,9
Clone ASB+FGE_18	8,6	15,3	11,3	99	92	39	15,8	29,1	33,5	0,9	1,0	0,8
Clone ASB+FGE_19	4,1	10,2	13,3	92	95	74	8,3	17,3	25,1	0,9	1,1	0,9
Clone ASB+FGE_20	2,9	11,5	16,7	99	97	90	6,3	18,1	25,6	1,0	1,3	0,9

Был проведен электрофорез в полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях и вестерн блот–анализ КЖ и лизатов лидерных клонов (Рисунок 28). Было показано, что электрофоретическая подвижность целевого фермента не отличается от препарата сравнения и соответствует молекулярному весу около 70 kDa (Рисунок 28–А, В). Лидерные клоны–продуценты коэкспрессировали вспомогательный фермент FGE (Рисунок 28–С, D).

В результате работы была получена панель клонов–продуцентов рекомбинантного лизосомального фермента ASB с вспомогательным ферментом FGE. Был создан исследовательский банк клеток продуцентов лизосомального фермента ASB с вспомогательным ферментом FGE. Дальнейшая разработка процесса культивирования моноклональных клеточных линий–продуцентов будет продвигаться в направлении оптимизации условий культивирования, поиск подходящих ростовых сред, подкормок, температурного режима культивирования и т. д.

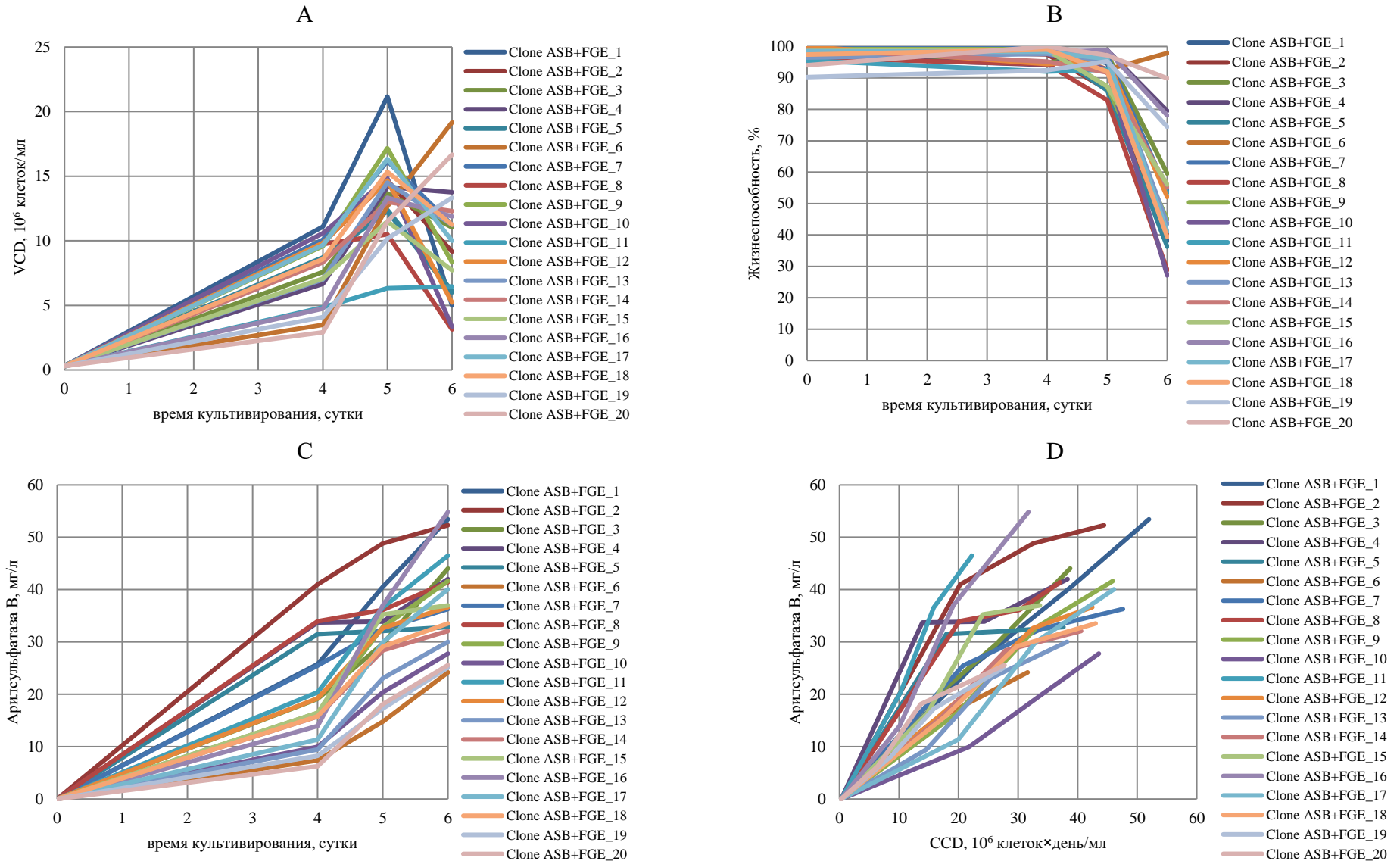


Рисунок 27. Характеристики клонов–продуцентов ASB+FGE во время периодического культивирования. А – плотность жизнеспособных клеток (10^6 клеток/мл); Б – жизнеспособность клонов (%); В – зависимость волюметрической продуктивности от кумулятивной клеточной плотности (10^6 клеток×день/мл); Г – волюметрическая продуктивность (мг/л).

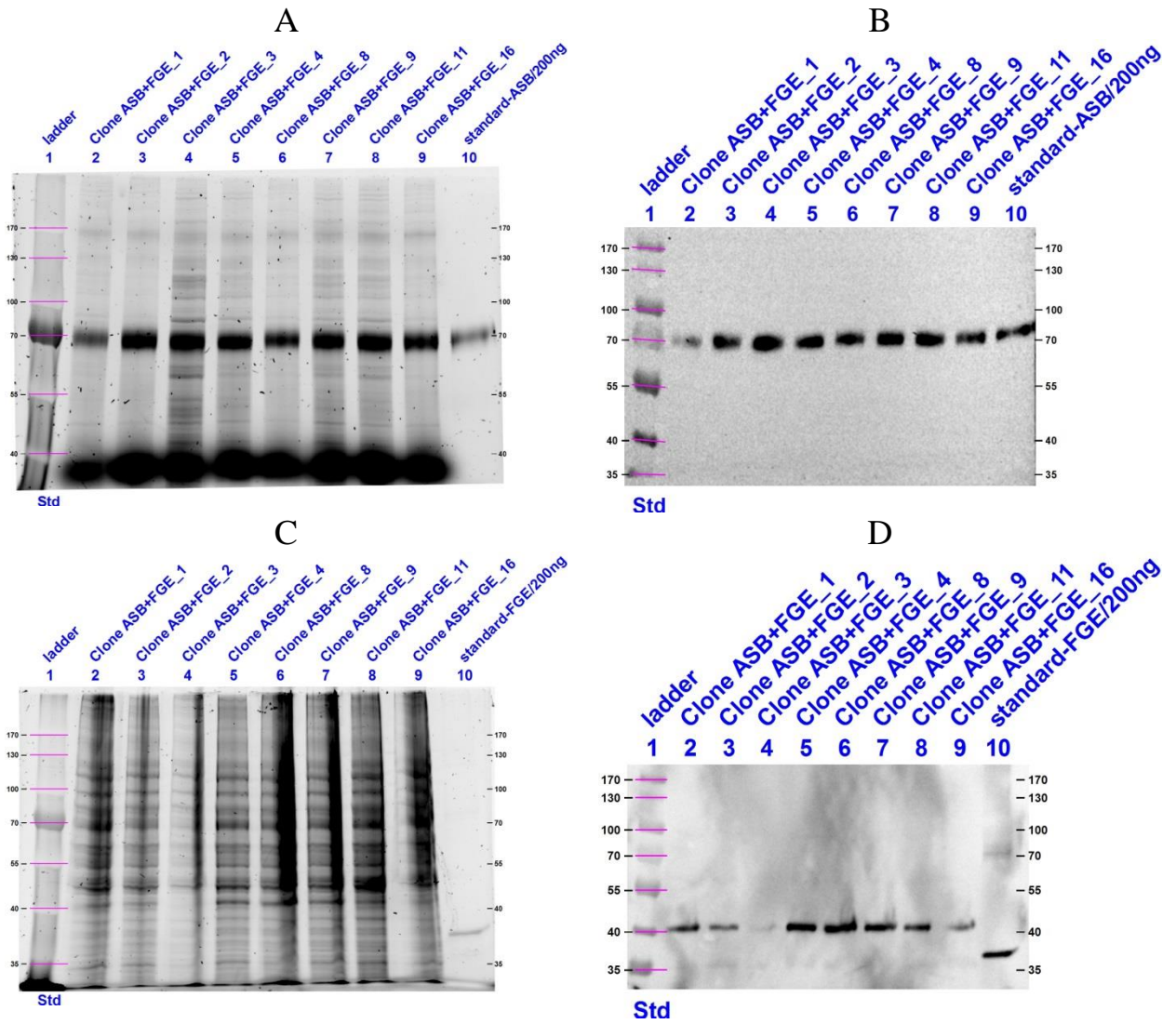


Рисунок 28. Электрофорез в восстанавливающих условиях и вестерн-блот анализ лидерных клонов–продуцентов ASB+FGE. Е – электрофорез КЖ клонов, 10 мкл/трек; F – вестерн-блот анализ КЖ, антитела anti-ASB (АО «Генериум, РФ); G – электрофорез лизатов, 2×10^5 клеток/трек; H – вестерн-блот анализ лизатов, антитела к FGE (ab 178809, Abcam); standard FGE – рекомбинантный FGE (ab115708, Abcam); standard ASB – рекомбинантный ASB (Наглазим, BioMarin).

5.4 Изучение влияния хлорида кальция и сульфата меди на ростовые и продукционные характеристики клонов-продуцентов коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин генерирующий фермент

В предыдущих экспериментах (Рисунок 21) было показано, что добавление в ростовую среду 300 мкМ хлорида кальция и 300 мкМ сульфата меди приводит к увеличению продуктивности клон-продуцента ASB. Для изучения влияния хлорида кальция и сульфата меди на ростовые и продукционные характеристики клонов-продуцентов ASB+FGE было проведено периодическое культивирование в среде с различными вариантами добавок (Рисунок 29).

При добавлении сульфата меди в ростовую среду наблюдали повышение жизнеспособности клонов-продуцентов ASB+FGE, увеличение клеточной плотности и продуктивности клонов до 150 мг/л (Рисунок 29–А, В, С).

Добавление сульфата меди и хлорида кальция в ростовую среду привело к повышению жизнеспособности клеток на протяжении всего процесса на 15%, и составляла не меньше 70% (Рисунок 29–А).

Следует отметить, что добавление хлорида кальция, как отдельного компонента в ростовую среду, не влияет на клеточную плотность и продуктивность культур (Рисунок 29–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). Следует отметить, что максимальное значение удельной продуктивности достигло 9,3 пг/(клетка×сут) (Рисунок 29–D).

Потребление глюкозы более интенсивно проходило при добавлении сульфата меди (Рисунок 29–Е), что связано с высокими клеточными плотностями (Рисунок 29–В). Уровень лактата в КЖ во всех условиях статистически не различался (Рисунок 29–F).

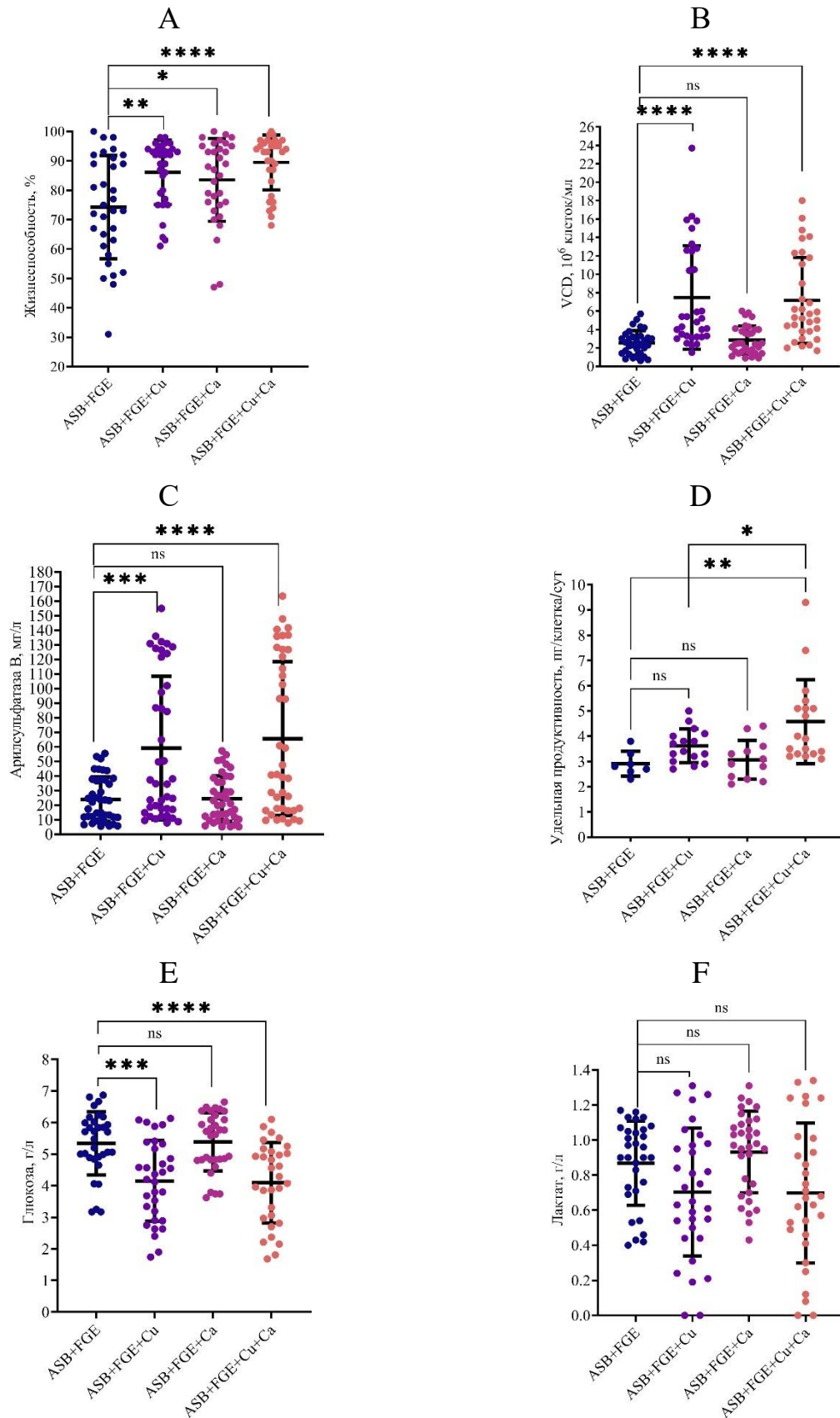


Рисунок 29. Характеристики клонов–продуцентов коэкспрессирующих ферменты ASB и FGE в процессе периодического культивирования на 4–7 сутки. А – жизнеспособность клеток, %; В – плотность жизнеспособных клеток, 10^6 клеток/мл; С – волюметрическая продуктивность, мг/л; D –

удельная продуктивность клеток, пг/клетка/сут; E – уровень глюкозы в КЖ, г/л; F – уровень лактата в КЖ, г/л; 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 P_{value} 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).

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.

5.5 Оптимизация условий культивирования лидерного клона–продуцента, коэкспрессирующего арилсульфатазу B и формилглицин генерирующий фермент, для последующего промышленного использования

Для дальнейшей разработки будущего производственного процесса из панели клонов был выбран один лидерный клон–продуцент ASB+FGE. Культивирование клона–продуцента ASB+FGE проводили в предполагаемом для будущего производства периодическом культивировании с подкормкой длительностью 12 суток в трех условиях: в стандартной ростовой среде (контроль), с добавлением 300 мкМ сульфата меди, с добавлением 300 мкМ сульфата меди и 300 мкМ хлорида кальция.

Максимальную жизнеспособность клеток клона, $\leq 80\%$ на 12 сутки культивирования, наблюдали при условии добавления сульфата меди и хлорида кальция (Рисунок 30–А). В ходе эксперимента плотность жизнеспособных клеток при условии культивирования в контрольных условиях была ниже, чем при

добавлении сульфата меди и хлорида кальция, $\sim 1,0 \times 10^7$ и $\sim 2,0-2,5 \times 10^7$ клеток/мл соответственно (Рисунок 30–В). Возможным объяснением данного эффекта является то, что стандартных концентрации ионов кальция и меди в ростовой среде недостаточно для конверсии больших количеств сверхэкспрессированной лизосомальной сульфатазы ASB, ее правильного фолдинга и последующей секреции в КЖ. Скорее всего, неактивный ASB с неправильным фолдингом накапливается в эндоплазматическом ретикулуме или цитоплазме, и, как следствие, оказывает токсическое действие на клетку (Рисунок 30–В) [86].

Как правило, потребление глюкозы и накопление лактата в КЖ отражают метаболическую активность клеток [77, 78]. Чаще всего, накопление лактата в КЖ [79], приводит к ингибированию роста клеток и, как следствие, снижению продукции целевого белка [80, 81]. Однако, существует метаболическое переключение клеток, вследствие которого, глюкоза и лактат начинают потребляться одновременно [87]. Для промышленных процессов периодического культивирования такие клоны–продуценты являются более предпочтительными, так как происходит эффективное потребление питательных веществ и высокий выход продукта за счет увеличения длительности процесса культивирования и достижения высоких клеточных плотностей. Помимо вышеперечисленного, существуют исследовательские работы, показывающие, что добавление в ростовую среду сульфата меди способствует увеличению продуктивности клеточной линии, клеточной плотности и жизнеспособности культуры за счет снижения уровня белков, связанных с клеточным стрессом: трансферрина и лактатдегидрогеназы [88]. В процессе нашего эксперимента было обнаружено, что лидерный клон–продуцент ASB+FGE с добавлением в ростовую среду двух компонентов (ионов кальция и ионов меди), одновременно активно потреблял и глюкозу и лактат в стационарной фазе процесса культивирования (Рисунок 30–С, D), в то время как этот же клон–продуцент без добавок не способен утилизировать лактат, который накапливается в КЖ во время культивирования (Рисунок 30–С). Аналогичное, но менее выраженное поведение культуры было отмечено в процессе культивирования клон–продуцента ASB (Рисунок 30–D).

Также, добавление в ростовую среду 300 мкМ 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 (Рисунок 30–E–F).

Удельная активность хроматографически очищенного препарата ASB, полученного в результате культивирования в контрольных условиях (периодического культивирование клон ASB без добавок солей металлов), в среднем составила около 11,9 ЕД/мг (Рисунок 31–А). Добавление Cu^{2+} увеличивает активность фермента приблизительно в 3 раза до 30 ЕД/мг. Благодаря ко-экспрессии белков ASB и FGE, удалось повысить удельную активность ASB в 7 раз до 70–90 ЕД/мг (Рисунок 31–А), активность полученного фермента ASB, в этом случае, соответствует активности коммерчески доступного препарата сравнения «Наглазим». Это соотносится с данными литературы о влиянии FGE на пострасляционную модификацию активного центра фермента ASB. Максимальный выход фермента достигался при добавлении сульфата меди в ростовую среду продуцентов коэкспрессирующих белки ASB и FGE (Рисунок 31–В) предположительно за счет повышения активности FGE, который в свою очередь может влиять на фолдинг и пространственную структуру ASB.

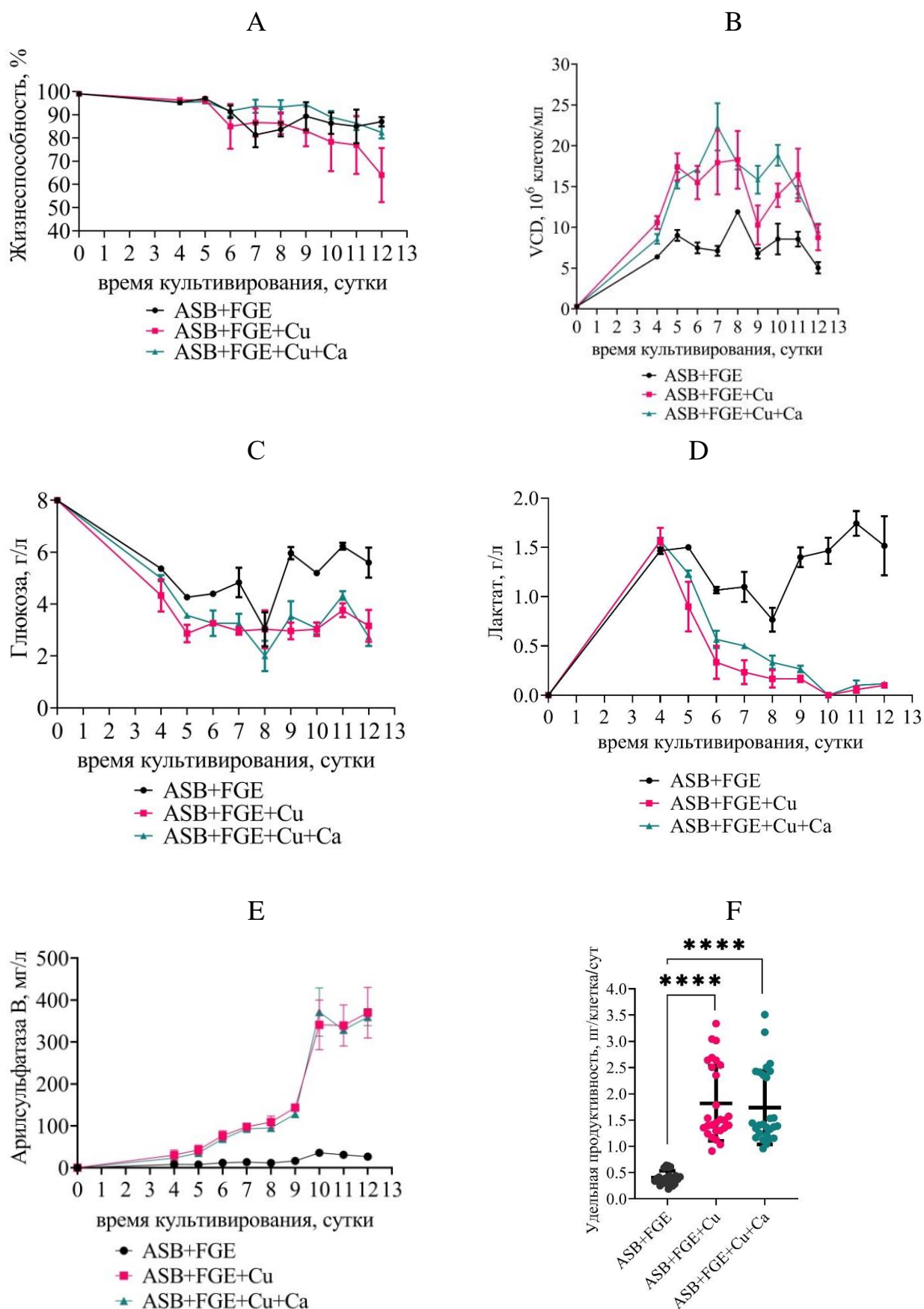


Рисунок 30. Характеристики лидерного клона, коэкспрессирующего ферменты ASB и FGE в процессе культивирования и активность очищенного полученного препарата ASB. А – жизнеспособность клеток, %; В – плотность

жизнеспособных клеток, 10^6 клеток/мл; С – уровень глюкозы, г/л; D – уровень лактата, г/л. E – продуктивность клеток, мг/л; F – удельная продуктивность клеток на 12 сутки культивирования, пг/клетка/сут; ASB+FGE – клон–продуцент коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE культивируемый на среде BCD; ASB+FGE+Cu – клон–продуцент коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди; 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 группу ASB+FGE.

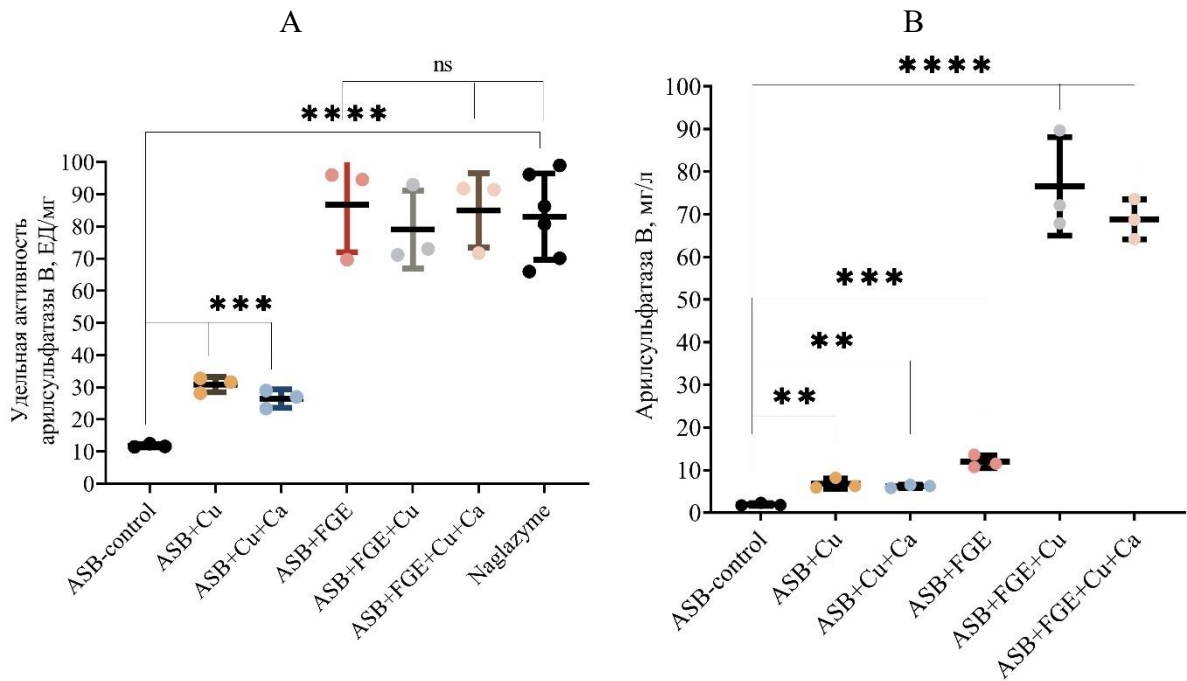


Рисунок 31. А – удельная активность фермента ASB после хроматографической очистки, ЕД/мг, В – продуктивность клеточных линий–продуцентов на 6 сутки культивирования. ASB–control–клон–продуцент ASB культивируемый на среде BCD; ASB–Cu–клон–продуцент ASB культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата 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 группу ASB–control.

Заключение по главе 5

В результате проведенных исследований, на основе суспензионной клеточной линии СНО получены высокопродуктивные клеточные линии-продуценты рекомбинантного фермента арилсульфатазы В, коэкспрессирующие целевой фермент арилсульфатазу В и вспомогательный формилглицин генерирующий фермент.

Увеличение выхода активного целевого фермента арилсульфатазы В с 5 до 100 мг/л было достигнуто за счет подбора при трансфекции оптимального соотношения плазмид, кодирующих целевой и вспомогательный ферменты. Наибольший выход фермента арилсульфатазы В наблюдался при соотношении плазмид 90% и 10% для ARSB и SUMF1, соответственно.

Продемонстрировано, что коэкспрессия вспомогательного формилглицин генерирующего фермента значительно способствует повышению удельной активности арилсульфатазы В.

Разработана технология суспензионного культивирования лидерного клон-продуцента, позволяющая получить 420 мг/л активного фермента арилсульфатазы В на 12 сутки непрерывного культивирования с подпиткой.

Полученный клон-продуцент и разработанные условия культивирования могут быть использованы для производства лекарственного препарата для ферментозаместительной терапии против мукополисахаридоза VI типа.

По результатам данных экспериментов опубликован ряд работ:

Выдан патент: 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". Публикация: 2021.08.19.

Опубликована статья: **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.

Еще одна работа принята к печати в журнале «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение»: **Тимонова С. С.** Оптимизация условий культивирования клона-продуцента, коэкспрессирующего арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент с целью повышения выхода фермента арилсульфатазы В / С. С. Тимонова, К. А. Смолова, И. А. Кирик, М. С. Пантюшенко, Р. Л. Анисимов, Р. А. Хамитов, А. А. Пискунов, В. Н. Бадэ.

ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ЭКСПРЕССИОННЫХ И РОСТОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК КЛОНОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ИДУРОНАТ-2-СУЛЬФАТАЗЫ И АРИЛСУЛЬФАТАЗЫ В

Стабильность продуктивности и ростовых показателей клонов–продуцентов рекомбинантных белков важна для технологического процесса культивирования в течение времени. Важно, чтобы полученная культура обладала стабильностью ключевых показателей для экономической целесообразности проекта.

Проведено изучение стабильности ростовых и продукционных показателей лидерных клонов-продуцентов терапевтических рекомбинантных белков I2S и ASB+FGE. Результаты исследований представлены в таблице 15 и на рисунках 32, 33. Жизнеспособность для двух клонов наблюдали высокую (не ниже 95%), без резких изменений или падения жизнеспособности за все время проведения эксперимента (Рисунок 32–А, 33–А). Также изучали динамику VCD клонов во время рутинных пересевов (Рисунок 32–В, 33–В). Клон I2S имел тенденцию к увеличению клеточной плотности к 60–й генераций (Рисунок 32–В). Клон ASB+FGE, напротив, незначительно снизил клеточную плотность с увеличением количества генераций (Рисунок 33–В). Явных тенденций к падению продуктивности культур выявлено не было (Рисунок 32–С, 33–С). Стабильность времени удвоения популяции (PDT) клонов отражает стабильность их ростовых характеристик. На рисунке 32–D, 33–D представлены графики для каждого клона по изменению PDT в течение изучения стабильности. Изменений в морфологии клеток к 60й генерации выявлено не было.

Сравнительное культивирование клонов на ранних и поздних генерациях (20 и 60 генераций) провели для подтверждения стабильности экспрессии целевого фермента. Динамика продуктивности клонов в сравнении представлена на рисунках 32–Е, 33–Е. Падения продуктивности для двух клонов I2S и ASB+FGE выявлено не было. Это подтверждает тот факт, что клоны стабильны. Жизнеспособность во время сравнительного культивирования также была одинаковой для культур ранних и поздних генераций (Рисунок 32–F, 33–F).

Изменений в достижении высоких плотностей во время культивирования выявлено не было, динамика VCD клеток клонов на поздних и ранних генерациях сравнима (Рисунок 32–G, 33–G).

Для выявления наличия изменений в продуктивности клонов с прохождением 60 генераций, значения продуктивности на ранних генерациях (0–30 генераций) сравнивали со значениями продуктивности на поздних генерациях (30–60 генераций) для каждого клона на 3 и 4 дня культивирования. Для обсчета статистических данных использовали t–критерий Стьюдента. Полученные данные для каждого клона представлены на диаграммах рисунков 32–H, 33–H. Снижений продуктивности выявлено не было.

Таким образом, не было выявлено статистически значимого падения продуктивности клонов I2S и ASB+FGE во время изучения характеристик клонов. Клоны являются стабильными и рекомендованы к промышленному процессу производства терапевтических белков.

Таблица 15 – Исследование стабильности продуктивности и ростовых характеристик суспензионной культуры клонов I2S и ASB+FGE в течение 60 генераций; VCD – плотность жизнеспособных клеток, PDT – время удвоения популяции в часах; CCD – кумулятивная клеточная плотность; Продуктивность – титр исследуемого белка; Qp – удельная продуктивность.

Клон I2S	Пассаж	Время, ч	Жизнеспособность, %	VCD, 10 ⁶ клеток/мл	Посевная концентрация, 10 ⁶ клеток/мл	PDT, ч	число генераций	Продуктивность, мг/л	CCD, 10 ⁶ клеток*сут/мл	Qp, пг/клетка/сут
	5	96	99	8,6	0,3	19,8	5	2,6	17,8	0,71
	6	168	98	2,7	0,3	22,7	9	5,9	4,5	1,31
	7	264	97	10,5	0,3	18,7	13	15,6	21,6	0,72
	8	336	99	4,7	0,3	18,1	18	7,5	7,5	1,00
	9	432	99	10,3	0,3	18,8	22	13,2	21,2	0,62
	10	504	99	4,1	0,3	19,1	27	6,1	6,6	0,93
	11	600	98	7,9	0,3	20,3	31	10,5	16,4	0,64
	12	672	100	5,3	0,3	17,4	36	5,3	8,4	0,63
	13	768	100	11	0,3	18,5	40	8,1	22,6	0,36
	14	840	100	3,4	0,3	20,6	45	3,7	5,6	0,67
	15	936	100	9,9	0,3	19,0	48	11,2	20,4	0,55
	16	1008	96	4,8	0,3	18,0	54	6,3	7,7	0,82
	17	1104	99	9,5	0,3	19,3	58	12,1	19,6	0,62
	18	1176	96	3,9	0,3	19,5	62	5,7	6,3	0,90
19	1272	98	12,6	0,3	17,8	67	12,2	25,8	0,47	

Клон ASB+FGE	Пассаж	Время, ч	Жизнеспособность, %	VCD, 10 ⁶ клеток/мл	Посевная концентрация, 10 ⁶ клеток/мл	PDT, ч	число генераций	Продуктивность, мг/л	CCD, 10 ⁶ клеток*сут/мл	Qp, пг/клетка/сут
	5	96	97	13,2	0,3	17,6	5	27,8	27,0	1,0
	6	72	100	4,4	0,3	18,6	9	3,8	7,1	0,5
	7	96	100	13,7	0,3	17,4	15	26,8	27,9	1,0
	8	72	100	4,3	0,3	18,8	19	3,1	6,8	0,4
	9	96	99	11,3	0,3	18,3	24	29,8	23,2	1,3
	10	72	99	6,8	0,3	16,0	28	7,5	10,7	0,7
	11	96	100	9,9	0,3	19,0	33	20,2	20,4	1,0
	12	72	100	5,4	0,3	17,3	38	3,4	8,5	0,4
	13	96	98	8,0	0,3	20,3	42	19,6	16,6	1,2
	14	72	100	4,9	0,3	17,9	46	6,0	7,8	0,8
	15	96	97	10,0	0,3	19,0	51	25,0	20,7	1,2
	16	72	98	5,3	0,3	17,4	56	6,9	8,4	0,8
	17	96	100	11,2	0,3	18,4	61	23,2	23,0	1,0
	18	72	98	5,0	0,3	17,8	65	5,2	7,9	0,7
19	96	99	11,5	0,3	18,3	70	27,9	23,6	1,2	

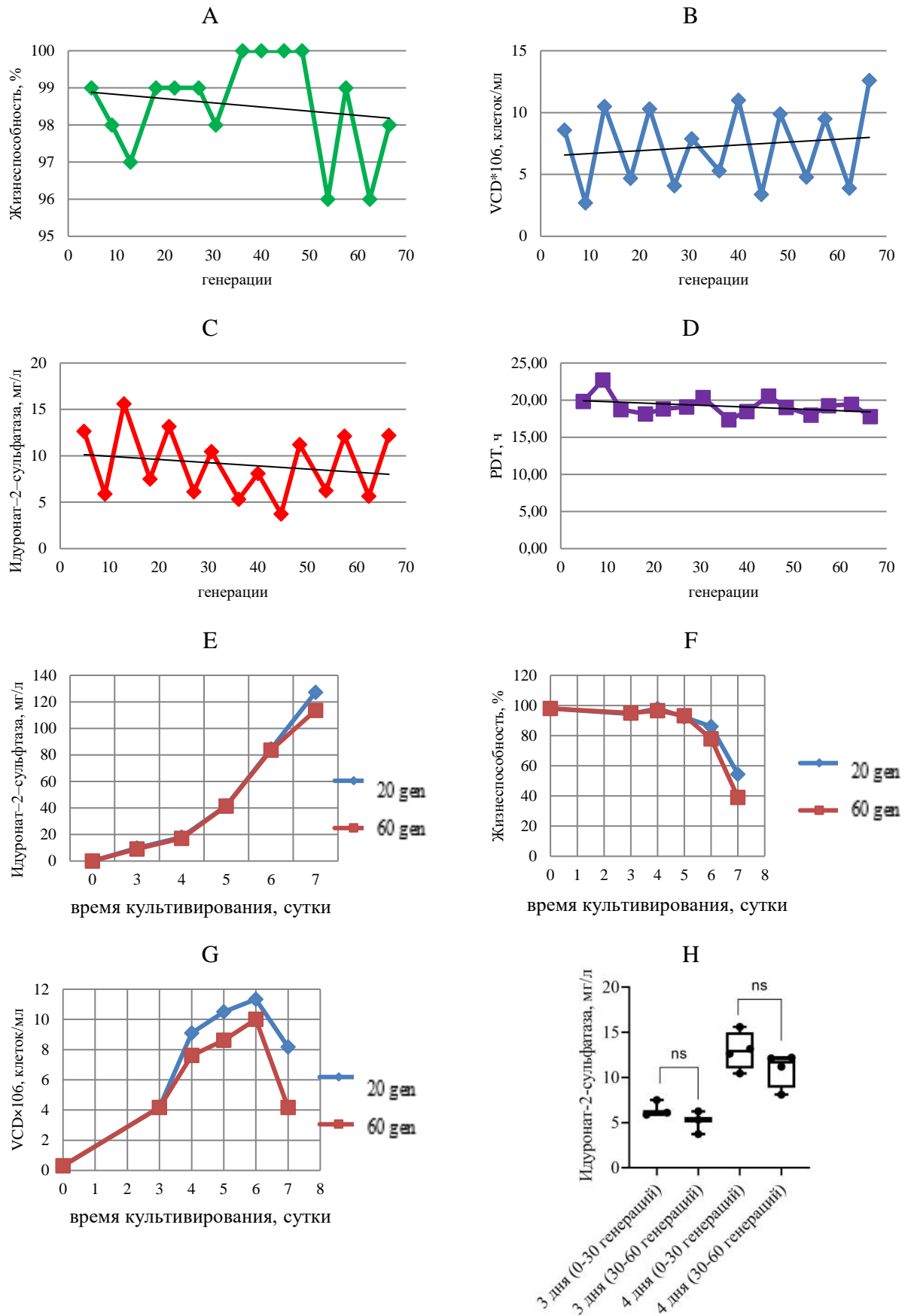


Рисунок 32. Исследование роста и продуктивности клон-продуцента I2S в течение 60 генераций. А – жизнеспособность, %; В – плотность

жизнеспособных клеток, 10^6 клеток/мл; С – динамика волюметрической продуктивности, мг/л; D – время удвоения популяции, часы; E – продуктивность клона на ранних и поздних генерациях в условиях сравнительного культивирования, мг/л; F – жизнеспособность клона на ранних и поздних генерациях в условиях сравнительного культивирования, %; G – динамика VCD на ранних и поздних генерациях в условиях сравнительного культивирования, 10^6 клеток/мл; H – сравнение продуктивности на ранних и поздних генерациях по t-критерию Стьюдента; для 3 и 4 дней рутинных пересевов культуры; gen – генерации; (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).

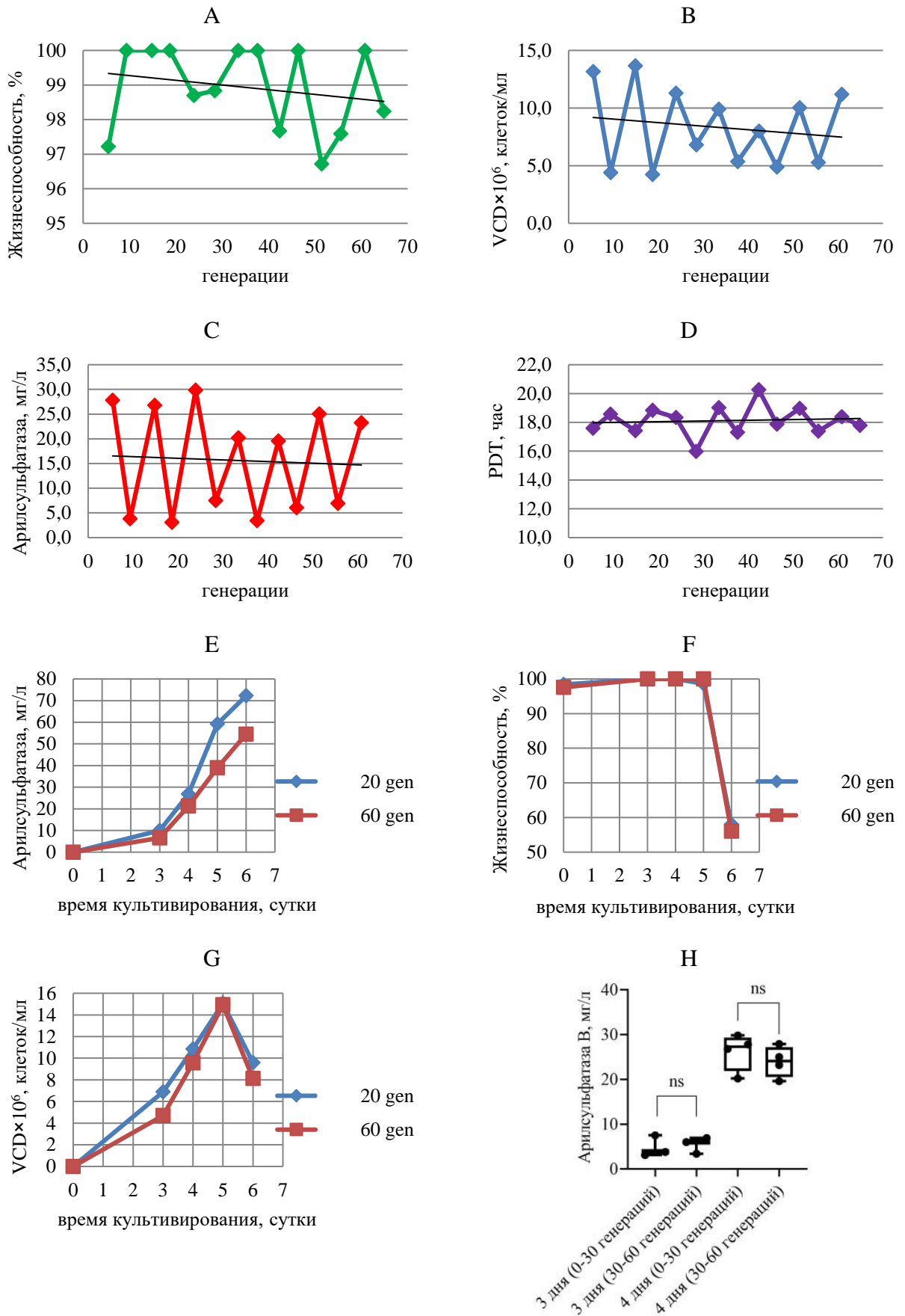


Рисунок 33. Исследование роста и продуктивности клона-продуцента ASB+FGF в течение 60 генераций. А – жизнеспособность, %; В – плотность жизнеспособных клеток, 10^6 клеток/мл; С – динамика волуметрической

продуктивность, мг/л; D – время удвоения популяции, часы; E – продуктивность клона на ранних и поздних генерациях в условиях сравнительного культивирования, мг/л; F – жизнеспособность клона на ранних и поздних генерациях в условиях сравнительного культивирования, %; G – динамика VCD на ранних и поздних генерациях в условиях сравнительного культивирования, 10^6 клеток/мл; H – сравнение продуктивности на ранних и поздних генерациях по t-критерию Стьюдента для 3 и 4 дней рутинных пересевов культуры; gen – генерации; (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).

Заключение по главе 6

По результатам данного эксперимента было установлено с помощью статистической обработки данных программы GraphPad: снижение экспрессии целевых ферментов у полученных клеточных линий продуцентов рекомбинантных ферментов арилсульфатазы B и идуронат-2-сульфатазы на поздних пассажах выявлено не было. Ростовые и продукционные показатели оставались в норме на протяжении более 60-ти генераций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие биофармацевтической отрасли в России – актуальная задача, одним из направлений которой является разработка терапевтических препаратов на основе рекомбинантных белков. На данный момент в РФ нет отечественных рекомбинантных ферментов для терапии МПС II и VI типов. Оригинальные препараты ферментов галсульфазы и идурсульфазы «Наглазим» и «Элапраза» соответственно, производятся компаниями США. В настоящее время эффективным способом лечения больных МПС II и VI типов является пожизненная ферментная терапия данными препаратами.

Указанные обстоятельства определили направление данной диссертационной работы, в которой была проведена разработка высокопродуктивных клеточных линий-продуцентов рекомбинантных активных ферментов арилсульфазы В и идуронат-2-сульфатазы для получения отечественных препаратов для терапии МПС II и VI типов.

Все полученные суспензионные клеточные линии культивировали без использования любых животных белков, что благоприятно сказывается на стандартизации производства и профиле безопасности белковых продуктов.

В качестве исходной клеточной линии была использована суспензионная клеточная линия СНО, которая зарекомендовала себя в последние десятилетия как наиболее перспективная и хорошо изученная для производства рекомбинантных белковых препаратов. В ходе работ использовали современное оборудование: роботизированная система для отбора колоний Clone Pix, высококонтрастная система для визуализации моноклонов Cell Metric, роботизированная система масштабирования 24-х минибиореакторов Ambr Tap Biosystems (ambr® 15 cell culture) и пр.

В диссертационной работе успешно решена технологическая проблема низкого выхода лизосомальных ферментов при сохранении удельной активности. Удельная активность лизосомального фермента идуронат-2-сульфатазы была увеличена за счет влияния на активный центр вспомогательного формилглицин

генерирующего фермента, участвующего в активации идуронат-2-сульфатазы путем добавления ионов меди в ростовую среду. Также проведена оптимизация технологии культивирования клонов-продуцентов идуронат-2-сульфатазы. Высокая продуктивность клонов-продуцентов арилсульфатазы В была достигнута за счет модификации клеточной линии СНО внутриклеточным формилглицин генерирующим ферментом, влияющим на активность целевого фермента арилсульфатазы В.

По результатам проведенной диссертационной работы предложена и экспериментально обоснована схема разработки и культивирования клеточных линий-продуцентов ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы. Приведенную схему разработки можно применить к созданию других биотехнологических препаратов, производимых с использованием клеточной линии СНО, в частности лизосомальных сульфатаз.

В результате проведенных работ были получены моноклональные высокопродуктивные и стабильные клеточные линии продуценты рекомбинантных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы.

Полученные клеточные линии использованы для наработки препаратов рекомбинантных терапевтических ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы для проведения дальнейших доклинических и клинических испытаний.

ВЫВОДЫ

1. Успешно проведены трансфекции клеточной линии СНО целевыми плазмидами, кодирующие гены целевых ферментов;

2. Проведено изучение ряда показателей, характеризующих моноклональные клеточные линии, выявлены лидерные кандидаты для исследований;

3. Получен промышленный стабильный клон–продуцент идуронат-2-сульфатазы. Проведена оптимизация условий культивирования лидерного клон–продуцента лизосомального фермента идуронат-2-сульфатазы:

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 непрерывное 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 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;

6. Благодаря данному исследованию, существенно снижена себестоимость производства рекомбинантных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

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

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

3. Создание отечественных препаратов рекомбинантных ферментов будет способствовать реализации государственной политики по развитию биофармацевтической отрасли в РФ и программы импортозамещения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

4-MU	–	4-метилумбеллиферон
AMBR (ambr® 15 cell culture)	–	роботизированная система минибореакторов Ambr Tap Biosystems
ARSB	–	ген, кодирующий арилсульфатазу В
ASB	–	рекомбинантный лизосомальный фермент арилсульфатаза В, Arylsulfatase В; N-acetylgalactosamine-4-sulfatase, chondroitinsulfatase, chondroitinase, acetylgalactosamine 4-sulfatase, N-acetylgalactosamine 4-sulfate sulfohydrolase, EC3.1.6.12
ASB+FGE	–	клон-продукт, коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE, культивируемый на среде BCD
ASB+FGE+Ca	–	клон-продукт, коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE, культивируемый на среде BCD с добавлением хлорида кальция;
ASB+FGE+Cu+Ca	–	клон-продукт, коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди и хлорида кальция
ASB+FGE+Cu	–	клон-продукт, коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди;
ASB-Cu	–	клон-продукт ASB, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди;
ASB-Cu+Ca	–	клон-продукт ASB, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди и хлорида кальция
ASB-control	–	клон-продукт ASB, культивируемый на среде BCD
BCD	–	среда для культивирования BalanCD Growth A
CCD	–	кумулятивная клеточная плотность, 10^6 клеток×сут/мл

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
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	– удельная (специфическая) продуктивность, мг/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
МПС VI	– мукополисахаридоз типа VI, синдром Марото-Лами
МПС VI	– мукополисахаридоз типа II, синдром Хантера
OD	– оптическая плотность
CCD	– кумулятивная клеточная плотность

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Batch	– режим культивирования без смены среды
Fed–batch	– режим культивирования без смены среды с добавлением различных подкормок
Блокировочный раствор	– раствор сухого обезжиренного молока для микробиологии 5 % (Merck, США) в буфере PBS–T
Клон	– моноклональная клеточная линия, происшедшая из одной клетки–предшественницы
Кондиционная среда	– культуральная жидкость без клеток, в которой культивировали продуценты в течение 48–72 часов
Лизат	– суспензия, содержащая остатки клеток–продуцентов, высвобожденных в процессе лизиса посредством добавления 2–меркаптоэтанола и кипячения при +95 ⁰ C
Минипул	– гетерогенная клеточная линия, продуцирующая целевой фермент
Пассаж	– время между двумя субкультивированиями
Фидирование	- добавление определенных компонентов в ростовую среду во время культивирования продуцентов

ПРИЛОЖЕНИЯ

Свидетельство о выдаче патента: «Клетка, продуцирующая с высокой эффективностью активный белок арилсульфатазу В, и способ получения этой клетки»



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Braunlin, E. A. Cardiac disease in patients with mucopolysaccharidosis: presentation, diagnosis and management / E.A. Braunlin, P.R. Harmatz, M. Scarpa, B. Furlanetto, C. Kampmann, J.P. Loehr, K.P. Ponder, W.C. Roberts, H.M. Rosenfeld, R. Giugliani // *Journal of Inherited Metabolic Disease*. – 2011. – Vol. 34. – № 6. – P. 1183–1197.
2. Bobrowski, L. Separating gene clustering in the rare mucopolysaccharidosis disease / L. Bobrowski, T. Łukaszuk, L. Gaffke, Z. Cyske, M. Ferenc, K. Pierzynowska, G. Węgrzyn // *Journal of Applied Genetics*. – 2022. – Vol. 63. – № 2. – P. 361–368.
3. Verma, S. A molecular genetics view on Mucopolysaccharidosis Type II / S. Verma, S. Pantoom, J. Petters, A.K. Pandey, A. Hermann, J. Lukas // *Mutation Research. Reviews in Mutation Research*. – 2021. – Vol. 788. – P. 108392.
4. Thomas, S. Gastrointestinal Manifestations in Mucopolysaccharidosis Type III: Review of Death Certificates and the Literature / S. Thomas, U. Ramaswami, M. Cleary, M. Yaqub, E.M. Raebel // *Journal of Clinical Medicine*. – 2021. – Vol. 10. – № 19. – P. 4445.
5. Aboulnasr, A. A. Prenatal diagnosis of mucopolysaccharidoses type II by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry in amniotic fluid / A.A. Aboulnasr, A. Elnouri, G. Abdel Sameea, A.S. Gouda, M.M. Ibrahim, T.A. Shalabi, K.R. Gaber // *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. – 2022. – Vol. 48. – № 3. – P. 682–687.
6. Burton, B. K. Newborn Screening for Mucopolysaccharidosis Type II in Illinois: An Update / B. K. Burton, R. Hickey, L. Hitchins // *International Journal of Neonatal Screening*. – 2020. – Vol. 6. – № 3. – P. 73.
7. Alberth, B. Clinical findings and pathogenesis of the Maroteaux-Lamy syndrome / B. Alberth, I. Süveges // *Fortschritte Der Ophthalmologie: Zeitschrift Der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*. – 1982. – Vol. 79. – № 2. – P. 104–105.
8. Calleja-Gero, M. L. Neuroimaging findings in patient series with mucopolysaccharidosis / M.L. Calleja Gero, L. González Gutiérrez-Solana, L. López

- Marín, M.A. López Pino, C. Fournier Del Castillo, A. Duat Rodríguez // *Neurologia* (Barcelona, Spain). – 2012. – Vol. 27. – № 7. – P. 407–413.
9. Ahmed, A. Brain volumes and cognition in mucopolysaccharidosis type VI / A. Ahmed, I. Nestrasil, V. Kovac, K. Delaney, B. Yund, P. Harmatz, S. Shankar, C. Whitley, E. Shapiro // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2014. – Vol. 111. – № 2. – P. S17.
10. Brunelli, M. J. Enzyme replacement therapy with galsulfase for mucopolysaccharidosis type VI / M. J. Brunelli, Á. N. Atallah, E. M. K. da Silva // *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2016. – Vol. 3. – P. CD009806.
11. Andrade, I. Fifteen years of enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis type VI (Maroteaux-Lamy syndrome): a case report / I. Andrade, R. Ribeiro, Z.A. Carneiro, R. Giugliani, C. Pereira, C. Cozma, D. Grinberg, L. Vilageliu, C.M. Lourenco // *Journal of Medical Case Reports*. – 2022. – Vol. 16.– № 1. – P. 46.
12. Akyol, M. U. Recommendations for the management of MPS VI: systematic evidence- and consensus-based guidance / M.U. Akyol, T.D. Alden, H. Amartino, J. Ashworth, K. Belani, K.I. Berger, A. Borgo, E. Braunlin, Y. Eto, J.I. Gold, A. Jester, S.A. Jones, C. Karsli, W. Mackenzie, D.R. Marinho, A. McFadyen, J. McGill, J.J. Mitchell, J. Muenzer, T. Okuyama, P.J. Orchard, B. Stevens, S. Thomas, R. Walker, R. Wynn, R. Giugliani, P. Harmatz, C. Hendriksz, M. Scarpa // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. – 2019. – Vol. 14. – № 1. – P. 118.
13. Al Sawaf, S. Neurological findings in Hunter disease: pathology and possible therapeutic effects reviewed / S. Al Sawaf, E. Mayatepek, B. Hoffmann // *Journal of Inherited Metabolic Disease*. – 2008. – Vol. 31. – № 4. – P. 473–480.
14. Akiyama, K. Enzyme augmentation therapy enhances the therapeutic efficacy of bone marrow transplantation in mucopolysaccharidosis type II mice / K. Akiyama, Y. Shimada, T. Higuchi, M. Ohtsu, H. Nakauchi, H. Kobayashi, T. Fukuda, H. Ida, Y. Eto, B.E. Crawford, J.R. Brown, T. Ohashi // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2014. – Vol. 111. – № 2. – P. 139–146.
15. Alcalde-Martín, C. First experience of enzyme replacement therapy with idursulfase in Spanish patients with Hunter syndrome under 5 years of age: case observations from the Hunter Outcome Survey (HOS) / C. Alcalde-Martín, J.M. Muro-Tudelilla, R. Cancho-

Candela, L.G. Gutiérrez-Solana, G. Pintos-Morell, M. Martí-Herrero, P. Munguira-Aguado, E. Galán-Gómez // *European Journal of Medical Genetics*. – 2010. – Vol. 53. – № 6. – P. 371–377.

16. Marucha, J. Efficacy of Enzyme Replacement Therapy on the range of motion of the upper and lower extremities in 16 Polish patients with mucopolysaccharidosis type II: A long-term follow-up study / J. Marucha, P. Lipiński, A. Tylki-Szymańska // *Acta Biochimica Polonica*. – 2022. – Vol. 69. – № 1. – P. 251–255.

17. Bond, C. S. Structure of a human lysosomal sulfatase / C.S. Bond, P.R. Clements, S.J. Ashby, C.A. Collyer, S.J. Harrop, J.J. Hopwood, J.M. Guss // *Structure*. – 1997. – Vol. 5. – № 2. – P. 277–289.

18. Zhang, W. Genetic analysis of 63 Chinese patients with mucopolysaccharidosis type II: Functional characterization of seven novel IDS variants / W. Zhang, T. Xie, H. Sheng, Y. Shao, Y. Lin, M. Jiang, A. Xu, X. Su, Z. Liu, X. Zhao, L. Liu, Y. Huang // *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. – 2019. – Vol. 491. – P. 114–120.

19. Mohamed, S. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): Clinical and biochemical aspects of the disease and approaches to its diagnosis and treatment / S. Mohamed, Q. Q. He, A. A. Singh, V. Ferro // *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. – 2020. – Vol. 77. – P. 71–117.

20. Mossman, J. Hunter's disease in a girl: association with X:5 chromosomal translocation disrupting the Hunter gene. / J. Mossman, S. Blunt, R. Stephens, E.E. Jones, M. Pembrey // *Archives of Disease in Childhood*. – 1983. – Vol. 58. – № 11. – P. 911–915.

21. Sukegawa, K. Hunter disease in a girl caused by R468Q mutation in the iduronate-2-sulfatase gene and skewed inactivation of the X chromosome carrying the normal allele / K. Sukegawa, X.Q. Song, M. Masuno, T. Fukao, N. Shimosawa, S. Fukuda, K. Isogai, H. Nishio, M. Matsuo, S. Tomatsu, N. Kondo, T. Orii // *Human Mutation*. – 1997. – Vol. 10. – № 5. – P. 361–367.

22. Julien, D. C. Immune Modulation for Enzyme Replacement Therapy in A Female Patient With Hunter Syndrome / D.C. Julien, K. Woolgar, L. Pollard, H. Miller, A. Desai, K. Lindstrom, P.S. Kishnani // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1000.
23. Khan, S. A. Epidemiology of mucopolysaccharidoses / S.A. Khan, H. Peracha, D. Ballhausen, A. Wiesbauer, M. Rohrbach, M. Gautschi, R.W. Mason, R. Giugliani, Y. Suzuki, K.E. Orii, T. Orii, S. Tomatsu // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2017. – Vol. 121. – № 3. – P. 227–240.
24. Ruijter, J. de. Heparan sulfate and dermatan sulfate derived disaccharides are sensitive markers for newborn screening for mucopolysaccharidoses types I, II and III / J. de Ruijter, M.H. de Ru, T. Wagemans, L. Ijlst, A.M. Lund, P.J. Orchard, G.B. Schaefer, F.A. Wijburg, N. van Vlies // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2012. – Vol. 107. – № 4. – P. 705–710.
25. Ulmer, J. E. Characterization of Glycosaminoglycan (GAG) Sulfatases from the Human Gut Symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron* Reveals the First GAG-specific Bacterial Endosulfatase / J.E. Ulmer, E.M. Vilén, R.B. Namburi, A. Benjdia, J. Beneteau, A. Malleron, D. Bonnaffé, P.-A. Driguez, K. Descroix, G. Lassalle, C. Le Narvor, C. Sandström, D. Spillmann, O. Berteau // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289. – № 35. – P. 24289–24303.
26. Demydchuk, M. Insights into Hunter syndrome from the structure of iduronate-2-sulfatase / M. Demydchuk, C.H. Hill, A. Zhou, G. Bunkóczi, P.E. Stein, D. Marchesan, J.E. Deane, R.J. Read // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – № 1. – P. 15786.
27. Vollebregt, A.A.M. Genotype-phenotype relationship in mucopolysaccharidosis II: predictive power of IDS variants for the neuronopathic phenotype / A.A.M. Vollebregt, M. Hoogeveen-Westerveld, M.A. Kroos, E. Oussoren, I. Plug, G.J. Ruijter, A.T. van der Ploeg, W.W.M.P. Pijnappel // *Developmental Medicine and Child Neurology*. – 2017. – Vol. 59. – № 10. – P. 1063–1070.
28. Muenzer, J. Ten years of the Hunter Outcome Survey (HOS): insights, achievements, and lessons learned from a global patient registry / J. Muenzer, S.A. Jones, A. Tyłki-Szymańska, P. Harmatz, N.J. Mendelsohn, N. Guffon, R. Giugliani, B.K. Burton, M.

- Scarpa, M. Beck, Y. Jangelind, E. Hernberg-Stahl, M.P. Larsen, T. Pulles, D.A.H. Whiteman // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. – 2017. – Vol. 12. – № 1. – P. 82.
29. Burrow, T. A. Review of the use of idursulfase in the treatment of mucopolysaccharidosis II / T. A. Burrow, N. D. Leslie // *Biologics: Targets & Therapy*. – 2008. – Vol. 2. – № 2. – P. 311–320.
30. Mathew, J. Mutations in ARSB in MPS VI patients in India / J. Mathew, S.M. Jagadeesh, M. Bhat, S. Udhaya Kumar, S. Thiyagarajan, S. Srinivasan // *Molecular Genetics and Metabolism Reports*. – 2015. – Vol. 4. – P. 53–61.
31. Remondino, R. G. Clinical Manifestations and Surgical Management of Spinal Lesions in Patients With Mucopolysaccharidosis: A Report of 52 Cases / R.G. Remondino, C.A. Tello, M. Noel, A.F. Wilson, E. Galaretto, E. Bersusky, L. Piantoni // *Spine Deformity*. – 2019. – Vol. 7. – № 2. – P. 298–303.
32. Harmatz, P. Long-term follow-up of endurance and safety outcomes during enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: Final results of three clinical studies of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase / P. Harmatz, R. Giugliani, I.V. D Schwartz, N. Guffon, E.L. Teles, M.C.S. Miranda, J.E. Wraith, M. Beck, L. Arash, M. Scarpa, D. Ketteridge, J.J. Hopwood, B. Plecko, R. Steiner, C.B. Whitley, P. Kaplan, Z.-F. Yu, S.J. Swiedler, C. Decker // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2008. – Vol. 94. – № 4. – P. 469–475.
33. Harmatz, P. The effect of galsulfase enzyme replacement therapy on the growth of patients with mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome) / P. Harmatz, C.J. Hendriksz, C. Lampe, J.J. McGill, R. Parini, E. Leão-Teles, V. Valayannopoulos, T.J. Cole, R. Matousek, S. Graham, N. Guffon, A. Quartel // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2017. – Vol. 122. – № 1-2. – P. 107–112.
34. Solano, M. L. Enzyme replacement therapy interruption in patients with Mucopolysaccharidoses: Recommendations for distinct scenarios in Latin America / M.L. Solano, A. Fainboim, J. Politei, G.L. Porras-Hurtado, A.M. Martins, C.F.M. Souza, F.M. Koch, H. Amartino, J.M. Satizábal, D.D.G. Horovitz, P.F.V. Medeiros, R.S. Honjo, C.M. Lourenço // *Molecular Genetics and Metabolism Reports*. – 2020. – Vol. 23. – P. 100572.

35. Lampe, C. Enzyme replacement therapy initiated in adulthood: Findings from the mucopolysaccharidosis VI Clinical Surveillance Program / C. Lampe, P.R. Harmatz, R. Parini, R. Sharma, E.L. Teles, J. Johnson, D. Sivam, Z. Sisic // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2019. – Vol. 127. – № 4. – P. 355–360.
36. Horovitz, D. D. G. Long-term impact of early initiation of enzyme replacement therapy in 34 MPS VI patients: A resurvey study / D.D.G. Horovitz, E.K.E.A. Leão, E.M. Ribeiro, A.M. Martins, A.L. Barth, J.I.C.F. Neri, M. Kerstenetzky, A.C.M. Siqueira, B.F.R. Ribeiro, C.A. Kim, F.C. Santos, J.F.S. Franco, L.C.L. Lichtvan, L.R. Giuliani, M.D.C.S. Rodrigues, R.C.F. Bonatti, T.B. Teixeira, A. Gonçalves, C.M. Lourenço, A.S.S. Pereira, A.X. Acosta // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2021. – Vol. 133. – № 1. – P. 94–99.
37. Garcia, P. Long-term outcomes of patients with mucopolysaccharidosis VI treated with galsulfase enzyme replacement therapy since infancy / P. Garcia, D. Phillips, J. Johnson, K. Martin, L.M. Randolph, H. Rosenfeld, P. Harmatz // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2021. – Vol. 133. – № 1. – P. 100–108.
38. Brady, R. O. Enzyme replacement for lysosomal diseases / R. O. Brady // *Annual Review of Medicine*. – 2006. – Vol. 57. – P. 283–296.
39. Rajkumar, V. Lysosomal Storage Disease / V. Rajkumar, V. Dumpa. – Text : electronic // StatPearls. – Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2022. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563270/> (accessed 5 February 2022).
40. Platt, F. M. Treating lysosomal storage disorders: Current practice and prospects: Lysosomes / F. M. Platt, R. H. Lachmann // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. – 2009. – Vol. 1793. – № 4. – P. 737–745.
41. Platt, F. M. Emptying the stores: lysosomal diseases and therapeutic strategies / F. M. Platt // *Nature Reviews. Drug Discovery*. – 2018. – Vol. 17. – Emptying the stores. – № 2. – P. 133–150.
42. Safary, A. Enzyme replacement therapies: what is the best option? / A. Safary, M. Akbarzadeh Khiavi, R. Mousavi, J. Barar, M.A. Rafi // *BioImpacts: BI*. – 2018. – Vol. 8. – № 3. – P. 153–157.

43. Solomon, M. Lysosomal enzyme replacement therapies: Historical development, clinical outcomes, and future perspectives / M. Solomon, S. Muro // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2017. – Vol. 118. – P. 109–134.
44. Veen, S. J. van der. Early start of enzyme replacement therapy in pediatric male patients with classical Fabry disease is associated with attenuated disease progression / S.J. van der Veen, S. Körver, A. Hirsch, C.E.M. Hollak, F.A. Wijburg, M.M. Brands, C. Tøndel, A.B.P. van Kuilenburg, M. Langeveld // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2022. – Vol. 135. – № 2. – P. 163–169.
45. Khan, A. The Safety of Agalsidase Alfa Enzyme Replacement Therapy in Canadian Patients with Fabry Disease Following Implementation of a Bioreactor Process / A. Khan, S.M. Sirrs, D.G. Bichet, C.F. Morel, A. Tocoian, L. Lan, M.L. West // *Drugs in R&D*. – 2021. – Vol. 21. – № 4. – P. 385–397.
46. Sevittz, H. Baseline characteristics of 32 patients with Gaucher disease who were treated with imiglucerase: South African data from the International Collaborative Gaucher Group (ICGG) Gaucher Registry / H. Sevittz, F. Laher, S.T. Varughese, M. Nel, A. McMaster, B.F. Jacobson // *South African Medical Journal*. – 2022. – Vol. 112. – № 1. – P. 13518.
47. Kuter, D. J. Open-label, expanded access study of taliglucerase alfa in patients with Gaucher disease requiring enzyme replacement therapy / D.J. Kuter, M. Wajnrajch, B. Hernandez, R. Wang, R. Chertkoff, A. Zimran // *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. – 2020. – Vol. 82. – P. 102418.
48. Smith, L. Long-term velaglucerase alfa treatment in children with Gaucher disease type 1 naïve to enzyme replacement therapy or previously treated with imiglucerase / L. Smith, W. Rhead, J. Charrow, S.P. Shankar, A. Bavdekar, N. Longo, R. Mardach, P. Harmatz, T. Hangartner, H.-M. Lee, E. Crombez, G.M. Pastores // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2016. – Vol. 117. – № 2. – P. 164–171.
49. Mistry, P. K. Transformation in pretreatment manifestations of Gaucher disease type 1 during two decades of alglucerase/imiglucerase enzyme replacement therapy in the International Collaborative Gaucher Group (ICGG) Gaucher Registry / P.K. Mistry, J.L. Batista, H.C. Andersson, M. Balwani, T.A. Burrow, J. Charrow, P. Kaplan, A. Khan, P.S.

Kishnani, E.H. Kolodny, B. Rosenbloom, C.R. Scott, N. Weinreb // *American Journal of Hematology*. – 2017. – Vol. 92. – № 9. – P. 929–939.

50. Vijay, S. Long-term survival with sebelipase alfa enzyme replacement therapy in infants with rapidly progressive lysosomal acid lipase deficiency: final results from 2 open-label studies / S. Vijay, A. Brassier, A. Ghosh, S. Fecarotta, F. Abel, S. Marulkar, S.A. Jones // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. – 2021. – Vol. 16. – № 1. – P. 13.

51. Wilson, A. Real-world data assessment of safety of home-based and hospital/outpatient-based laronidase enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I / A. Wilson, R. M. Colzani, A. L. Flores // *Molecular Genetics and Metabolism Reports*. – 2021. – Vol. 27. – P. 100736.

52. Lampe, C. Long-term experience with enzyme replacement therapy (ERT) in MPS II patients with a severe phenotype: an international case series / C. Lampe, A.-K. Bosserhoff, B.K. Burton, R. Giugliani, C.F. de Souza, C. Bittar, N. Muschol, R. Olson, N.J. Mendelsohn // *Journal of Inherited Metabolic Disease*. – 2014. – Vol. 37. – № 5. – P. 823–829.

53. Lee, C.-L. Clinical Utility of Elosulfase Alfa in the Treatment of Morquio A Syndrome / C.-L. Lee, C.-K. Chuang, H.-C. Chiu, R.-Y. Tu, Y.-T. Lo, Y.-H. Chang, S.-P. Lin, H.-Y. Lin // *Drug Design, Development and Therapy*. – 2022. – Vol. 16. – P. 143–154.

54. Ditters, I. A. M. Effect of alglucosidase alfa dosage on survival and walking ability in patients with classic infantile Pompe disease: a multicentre observational cohort study from the European Pompe Consortium / I.A.M. Ditters, H.H. Huidekoper, M.E. Kruijshaar, D. Rizopoulos, A. Hahn, T.E. Mongini, F. Labarthe, M. Tardieu, B. Chabrol, A. Brassier, R. Parini, G. Parenti, N.A.M.E. van der Beek, A.T. van der Ploeg, J.M.P. van den Hout // *The Lancet. Child & Adolescent Health*. – 2022. – Vol. 6. – № 1. – P. 28–37.

55. Sands, M. S. A Hitchhiker's Guide to the Blood–brain Barrier: In Trans Delivery of a Therapeutic Enzyme / M. S. Sands // *Molecular Therapy*. – 2014. – Vol. 22. – № 3. – P. 483–484.

56. Kong, W. Update of treatment for mucopolysaccharidosis type III (sanfilippo syndrome) / W. Kong, Y. Yao, J. Zhang, C. Lu, Y. Ding, Y. Meng // *European Journal of Pharmacology*. – 2020. – Vol. 888. – P. 173562.
57. Guffon, N. Evaluation of miglustat treatment in patients with type III mucopolysaccharidosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study / N. Guffon, S. Bin-Dorel, E. Decullier, C. Paillet, J. Guitton, A. Fouilhoux // *The Journal of Pediatrics*. – 2011. – Vol. 159. – № 5. – P. 838–844.e1.
58. Kaidonis, X. N-butyldeoxynojirimycin treatment restores the innate fear response and improves learning in mucopolysaccharidosis IIIA mice / X. Kaidonis, S. Byers, E. Ranieri, P. Sharp, J. Fletcher, A. Derrick-Roberts // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2016. – Vol. 118. – № 2. – P. 100–110.
59. Ponder, K. P. Gene therapy for mucopolysaccharidosis / K. P. Ponder, M. E. Haskins // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2007. – Vol. 7. – № 9. – P. 1333–1345.
60. Díaz, J. C. L. Advances in the Development of Pharmacological Chaperones for the Mucopolysaccharidoses / J. C. L. Díaz, J. C. del Castillo, E. A. Rodríguez-López, C. J. Alméciga-Díaz // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 21. – № 1. – P. 232.
61. Parenti, G. Pharmacological chaperone therapy for lysosomal storage diseases / G. Parenti, M. Moracci, S. Fecarotta, G. Andria // *Future Medicinal Chemistry*. – 2014. – Vol. 6. – № 9. – P. 1031–1045.
62. Alméciga-Díaz, C. J. Identification of Ezetimibe and Pranlukast as Pharmacological Chaperones for the Treatment of the Rare Disease Mucopolysaccharidosis Type IVA / C.J. Alméciga-Díaz, O.A. Hidalgo, S. Olarte-Avellaneda, A. Rodríguez-López, E. Guzman, R. Garzón, L.N. Pimentel-Vera, M.A. Puentes-Tellez, A.F. Rojas-Rodriguez, K. Gorshkov, R. Li, W. Zheng // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2019. – Vol. 62. – № 13. – P. 6175–6189.
63. Zhu, S. Iminosugar C-Glycosides Work as Pharmacological Chaperones of NAGLU, a Glycosidase Involved in MPS IIIB Rare Disease* / S. Zhu, Y. Jagadeesh, A.T. Tran, S. Imaeda, A. Boraston, D.S. Alonzi, A. Poveda, Y. Zhang, J. Désiré, J. Charollais-Thoenig, S. Demotz, A. Kato, T.D. Butters, J. Jiménez-Barbero, M. Sollogoub, Y. Blériot //

Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany). – 2021. – Vol. 27. – № 44. – P. 11291–11297.

64. Bhayankaram, N. Umbilical cord blood transplant is the preferred stem cell source in children with MPS IH (Hurler syndrome) undergoing hematopoietic stem cell transplantation / N. Bhayankaram, S. Jones, J. Kinsella, M. Coussons, H. Church, A. Broomfield, J. Mercer, K. Tylee, D. Bonney, R. Wynn // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2020. – Vol. 129. – P. S131.

65. Köhn, A. F. Hematopoietic stem cell transplantation in mucopolysaccharidosis type IIIA: A case description and comparison with a genotype-matched control group / A.F. Köhn, L. Grigull, M. du Moulin, S. Kabisch, L. Ammer, C. Rudolph, N.M. Muschol // *Molecular Genetics and Metabolism Reports*. – 2020. – Vol. 23. – P. 100578.

66. Wiegmann, E. M. Arylsulfatase K, a novel lysosomal sulfatase / E.M. Wiegmann, E. Westendorf, I. Kalus, T.H. Pringle, T. Lübke, T. Dierks // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288. – № 42. – P. 30019–30028.

67. Diez-Roux, G. Sulfatases and human disease / G. Diez-Roux, A. Ballabio // *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. – 2005. – Vol. 6. – P. 355–379.

68. Sardiello, M. Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship / M. Sardiello, I. Annunziata, G. Roma, A. Ballabio // *Human Molecular Genetics*. – 2005. – Vol. 14. – № 21. – P. 3203–3217.

69. Ghosh, D. Three-dimensional structures of sulfatases / D. Ghosh // *Methods in Enzymology*. – 2005. – Vol. 400. – P. 273–293.

70. Zhao, R.-R. Targeting Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycans to Treat Cardiac Fibrosis in Pathological Remodeling / R.-R. Zhao, M. Ackers-Johnson, J. Stenzig, C. Chen, T. Ding, Y. Zhou, P. Wang, S.L. Ng, P.Y. Li, G. Teo, P.M. Rudd, J.W. Fawcett, R.S.Y. Foo // *Circulation*. – 2018. – Vol. 137. – № 23. – P. 2497–2513.

71. Boltes, I. 1.3 Å Structure of Arylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa* Establishes the Catalytic Mechanism of Sulfate Ester Cleavage in the Sulfatase Family / I. Boltes, H. Czapinska, A. Kahnert, R. von Bülow, T. Dierks, B. Schmidt, K. von Figura, M.A. Kertesz, I. Usón // *Structure*. – 2001. – Vol. 9. – № 6. – P. 483–491.

72. Dierks, T. Conversion of cysteine to formylglycine: A protein modification in the endoplasmic reticulum / T. Dierks, B. Schmidt // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – P. 6.
73. Appel, M. J. Formylglycine, a post-translationally generated residue with unique catalytic capabilities and biotechnology applications / M. J. Appel, C. R. Bertozzi // *ACS chemical biology.* – 2015. – Vol. 10. – № 1. – P. 72–84.
74. Dierks, T. Posttranslational formation of formylglycine in prokaryotic sulfatases by modification of either cysteine or serine / T. Dierks, C. Miech, J. Hummerjohann, B. Schmidt, M.A. Kertesz, K. von Figura // *The Journal of Biological Chemistry.* – 1998. – Vol. 273. – № 40. – P. 25560-25564.
75. Dierks, T. Sequence determinants directing conversion of cysteine to formylglycine in eukaryotic sulfatases. / T. Dierks, M.R. Lecca, P. Schlotterhose, B. Schmidt, K. von Figura // *The EMBO Journal.* – 1999. – Vol. 18. – № 8. – P. 2084–2091.
76. Roeser, D. A general binding mechanism for all human sulfatases by the formylglycine-generating enzyme / D. Roeser, A. Preusser-Kunze, B. Schmidt, K. Gasow, J.G. Wittmann, T. Dierks, K. von Figura, M.G. Rudolph // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2006. – Vol. 103. – № 1. – P. 81–86.
77. Dickmanns, A. Crystal structure of human pFGE, the paralog of the Calpha-formylglycine-generating enzyme / A. Dickmanns, B. Schmidt, M.G. Rudolph, M. Mariappan, T. Dierks, K. von Figura, R. Ficner // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2005. – Vol. 280. – № 15. – P. 15180–15187.
78. Dierks, T. Molecular Basis for Multiple Sulfatase Deficiency and Mechanism for Formylglycine Generation of the Human Formylglycine-Generating Enzyme / T. Dierks, A. Dickmanns, A. Preusser-Kunze // *Cell.* – Vol. 121. – № 4. – P. 541–552.
79. Schlotawa, L. Recognition and ER Quality Control of Misfolded Formylglycine-Generating Enzyme by Protein Disulfide Isomerase / L. Schlotawa, M. Wachs, O. Bernhard, F.J. Mayer, T. Dierks, B. Schmidt, K. Radhakrishnan // *Cell Reports.* – 2018. – Vol. 24. – № 1. – P. 27–37. e4.

80. Mariappan, M. Expression, localization, structural, and functional characterization of pFGE, the paralog of the Calpha-formylglycine-generating enzyme / M. Mariappan, A. Preusser-Kunze, M. Balleininger, N. Eiselt, B. Schmidt, S.L. Gande, D. Wenzel, T. Dierks, K. von Figura // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280. – № 15. – P. 15173–15179.
81. Peng, J. Eukaryotic formylglycine-generating enzyme catalyses a monooxygenase type of reaction / J. Peng, S. Alam, K. Radhakrishnan, M. Mariappan, M.G. Rudolph, C. May, T. Dierks, K. von Figura, B. Schmidt // *The FEBS journal*. – 2015. – Vol. 282. – № 17. – P. 3262–3274.
82. Röser, D. Kristallisation von GGA-Proteinen und röntgenkristallographische Untersuchungen am C α -Formylglycin Generierenden Enzym / D. Röser. – 2007. – Text : electronic. – URL: <https://ediss.uni-goettingen.de/handle/11858/00-1735-0000-0006-B61E-1> (accessed 5 February 2022).
83. York, D. Generating aldehyde-tagged antibodies with high titers and high formylglycine yields by supplementing culture media with copper (II) / D. York, J. Baker, P.G. Holder, L.C. Jones, P.M. Drake, R.M. Barfield, G.T. Bleck, D. Rabuka // *BMC Biotechnology*. – 2016. – Vol. 16. – № 1. – P. 23.
84. Knop, M. Copper is a Cofactor of the Formylglycine-Generating Enzyme / M. Knop, T. Q. Dang, G. Jeschke, F. P. Seebeck // *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*. – 2017. – Vol. 18. – № 2. – P. 161–165.
85. Appel, M. J. Formylglycine-generating enzyme binds substrate directly at a mononuclear Cu(I) center to initiate O₂ activation / M.J. Appel, K.K. Meier, J. Lafrance-Vanasse, H. Lim, C.-L. Tsai, B. Hedman, K.O. Hodgson, J.A. Tainer, E.I. Solomon, C.R. Bertozzi // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2019. – Vol. 116. – № 12. – P. 5370–5375.
86. Bojarová, P. Sulfotransferases, sulfatases and formylglycine-generating enzymes: a sulfation fascination / P. Bojarová, S. J. Williams // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2008. – Vol. 12. – № 5. – P. 573–581.
87. Shikano, S. Secretory Pathway / S. Shikano, K. J. Colley. – Text : electronic // *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)* / W. J. Lennarz, M. D. Lane eds.

– Waltham: Academic Press, 2013. – P. 203–209. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123786302005077> (accessed 5 February 2022).

88. Coutinho, M. F. Mannose-6-phosphate pathway: a review on its role in lysosomal function and dysfunction / M. F. Coutinho, M. J. Prata, S. Alves // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2012. – Vol. 105. – Mannose-6-phosphate pathway. – № 4. – P. 542–550.

89. Rohrer, J. Lysosomal Hydrolase Mannose 6-Phosphate Uncovering Enzyme Resides in the trans-Golgi Network / J. Rohrer, R. Kornfeld // *Molecular Biology of the Cell*. – 2001. – Vol. 12. – № 6. – P. 1623–1631.

90. Olson, L. J. Identification of a fourth mannose 6-phosphate binding site in the cation-independent mannose 6-phosphate receptor / L.J. Olson, A.C. Castonguay, Y. Lasanajak, F.C. Peterson, R.D. Cummings, D.F. Smith, N.M. Dahms // *Glycobiology*. – 2015. – Vol. 25. – № 6. – P. 591–606.

91. Arighi, C. N. Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor / C.N. Arighi, L.M. Hartnell, R.C. Aguilar, C.R. Haft, J.S. Bonifacino // *The Journal of Cell Biology*. – 2004. – Vol. 165. – № 1. – P. 123–133.

92. Alberts, B. Transport from the Trans Golgi Network to Lysosomes / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts. – Text : electronic // *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. – 2002. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26844/> (accessed 5 February 2022).

93. Olson, L. J. Structural Insights into the Mechanism of pH-dependent Ligand Binding and Release by the Cation-dependent Mannose 6-Phosphate Receptor / L. J. Olson, O. Hindsgaul, N. M. Dahms, J.-J. P. Kim // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283. – № 15. – P. 10124–10134.

94. Bohnsack, R. N. Cation-independent Mannose 6-Phosphate Receptor / R.N. Bohnsack, X. Song, L.J. Olson, M. Kudo, R.R. Gotschall, W.M. Canfield, R.D. Cummings, D.F. Smith, N.M. Dahms // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – Vol. 284. – № 50. – P. 35215–35226.

95. Ghosh, P. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale / P. Ghosh, N. M. Dahms, S. Kornfeld // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2003. – № 4. – P. 202–213.
96. Lu, R.-M. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases / R.-M. Lu, Y.-C. Hwang, I.-J. Liu, C.-C. Lee, H.-Z. Tsai, H.-J. Li, H.-C. Wu // *Journal of Biomedical Science*. – 2020. – Vol. 27. – № 1. – P. 1.
97. Hughes, J. Principles of early drug discovery / J. Hughes, S. Rees, S. Kalindjian, K. Philpott // *British Journal of Pharmacology*. – 2011. – Vol. 162. – № 6. – P. 1239–1249.
98. Tihanyi, B. Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production / B. Tihanyi, L. Nyitray // *Drug Discovery Today: Technologies*. – 2020. – Vol. 38. – P. 25–34.
99. Zhou, Z. Construction of a stable TrxR1 knockout HCT-116 cell line using CRISPR/Cas9 gene editing system / Z. Zhou, X. Lü, L. Zhu, J. Zhou, H. Huang, C. Zhang, X. Liu // *Chinese Journal of Biotechnology*. – 2022. – Vol. 38. – № 3. – P. 1074–1085.
100. Adhikari, B. Generation of auxin inducible degron (AID) knock-in cell lines for targeted protein degradation in mammalian cells / B. Adhikari, A. Narain, E. Wolf // *STAR protocols*. – 2021. – Vol. 2. – № 4. – P. 100949.
101. Chakrabarti, L. Mitochondrial membrane potential-enriched CHO host: a novel and powerful tool for improving biomanufacturing capability / L. Chakrabarti, R. Chaerkady, J. Wang, S.H.S. Weng, C. Wang, C. Qian, L. Cazares, S. Hess, P. Amaya, J. Zhu, D. Hatton // *mAbs*. – 2022. – Vol. 14. – № 1. – P. 2020081.
102. Karki, U. Cellular engineering of plant cells for improved therapeutic protein production / U. Karki // *Plant Cell Reports*. – 2021. – P. 13.
103. Lalonde, M.-E. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells / M.-E. Lalonde, Y. Durocher // *Journal of Biotechnology*. – 2017. – Vol. 251. – P. 128–140.
104. Ghaderi, D. Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation / D. Ghaderi, M. Zhang, N. Hurtado-Ziola, A. Varki // *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*. – 2012. – Vol. 28. – P. 147–175.

105. Graumann, K. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems / K. Graumann, A. Premstaller // *Biotechnology Journal*. – 2006. – Vol. 1. – № 2. – P. 164–186.
106. Gerngross, T. U. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi / T. U. Gerngross // *Nature Biotechnology*. – 2004. – Vol. 22. – № 11. – P. 1409–1414.
107. Grabowski, G. A. Taliglucerase alfa: an enzyme replacement therapy using plant cell expression technology / G. A. Grabowski, M. Golembo, Y. Shaaltiel // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2014. – Vol. 112. – № 1. – P. 1–8.
108. Gupta, P. Spotlight on taliglucerase alfa in the treatment of pediatric patients with type 1 Gaucher disease / P. Gupta, G. M. Pastores // *Pediatric Health, Medicine and Therapeutics*. – 2017. – Vol. 8. – P. 73–81.
109. Zimran, A. Taliglucerase alfa: safety and efficacy across 6 clinical studies in adults and children with Gaucher disease / A. Zimran, M. Wajnrajch, B. Hernandez, G.M. Pastores // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. – 2018. – Vol. 13. – № 1. – P. 36.
110. Plasson, C. Production of recombinant proteins in suspension-cultured plant cells / C. Plasson, R. Michel, D. Lienard, C. Saint-Jore-Dupas, C. Sourrouille, G.G. de March, V. Gomord // *Methods in Molecular Biology*. – 2009. – Vol. 483. – P. 145–161.
111. Schillberg, S. Critical Analysis of the Commercial Potential of Plants for the Production of Recombinant Proteins / S. Schillberg, N. Raven, H. Spiegel, S. Rasche, M. Buntru // *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – Vol. 10. – P. 720.
112. Dumont, J. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives / J. Dumont, D. Eewart, B. Mei, S. Estes, R. Kshirsagar // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2016. – Vol. 36. – № 6. – P. 1110–1122.
113. Ruppach, H. Viral safety for biotherapeutics and biosimilar / H. Ruppach // *Drug Discovery Today: Technologies*. – 2020. – Vol. 37. – P. 23–29.
114. Graham, F. L. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5 / F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell, R. Nairn // *The Journal of General Virology*. – 1977. – Vol. 36. – № 1. – P. 59–74.

115. Tan, E. HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors / E. Tan, C. S. H. Chin, Z. F. S. Lim, S. K. Ng // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2021. – Vol. 9. – P. 796991.
116. Rasheed, S. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080) / S. Rasheed, W.A. Nelson-Rees, E.M. Toth, P. Arnstein, M.B. Gardner // *Cancer*. – 1974. – Vol. 33. – № 4. – P. 1027–1033.
117. Pau, M. G. The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines / M.G. Pau, C. Ophorst, M.H. Koldijk, G. Schouten, M. Mehtali, F. Uytdehaag // *Vaccine*. – 2001. – Vol. 19. – № 17-19. – P. 2716–2721.
118. Bartenschlager, R. Hepatitis C Virus / R. Bartenschlager, S. Bühler. – Text : electronic // *Encyclopedia of Virology (Third Edition)* / B. W. J. Mahy, M. H. V. Van Regenmortel eds. – Oxford : Academic Press, 2008. – P. 367–374. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123744104004167> (accessed 5 February 2022).
119. Fabre, M. L. Baculovirus-Derived Vectors for Immunization and Therapeutic Applications / M.L. Fabre, P.N. Arrías, T. Masson, M.L. Pidre, V. Romanowski // *Emerging and Reemerging Viral Pathogens*. – 2020. – P. 197–224.
120. Felberbaum, R. S. The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors / R. S. Felberbaum // *Biotechnology Journal*. – 2015. – Vol. 10. – № 5. – P. 702–714.
121. Yee, C. M. The Coming Age of Insect Cells for Manufacturing and Development of Protein Therapeutics / C. M. Yee, A. J. Zak, B. D. Hill, F. Wen // *Industrial & engineering chemistry research*. – 2018. – Vol. 57. – № 31. – P. 10061–10070.
122. Stifter, S. A. Purification and biological characterization of soluble, recombinant mouse IFN β expressed in insect cells / S.A. Stifter, J.A. Gould, N.E. Mangan, H.H. Reid, J. Rossjohn, P.J. Hertzog, N.A. de Weerd // *Protein Expression and Purification*. – 2014. – Vol. 94. – P. 7–14.
123. Kamolratanakul, S. Human Papillomavirus Vaccine Efficacy and Effectiveness against Cancer / S. Kamolratanakul, P. Pitisuttithum // *Vaccines*. – 2021. – Vol. 9. – № 12. – P. 1413.

124. Cox, M. M. J. FluBlok, a recombinant hemagglutinin influenza vaccine / M. M. J. Cox, P. A. Patriarca, J. Treanor // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2008. – Vol. 2. – № 6. – P. 211–219.
125. Zheng, G.-L. Serumfree culture of the suspension cell line QB-Tn9-4s of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, is highly productive for virus replication and recombinant protein expression / G.-L. Zheng, H.-X. Zhou, C.-Y. Li // *Journal of Insect Science*. – 2014. – Vol. 14. – P. 24.
126. Ghaderi, D. Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins / D. Ghaderi, R.E. Taylor, V. Padler-Karavani, S. Diaz, A. Varki // *Nature Biotechnology*. – 2010. – Vol. 28. – № 8. – P. 863–867.
127. Wagner, E. Determination of size variants by CE-SDS for approved therapeutic antibodies: Key implications of subclasses and light chain specificities / E. Wagner, O. Colas, S. Chenu, A. Goyon, A. Murisier, S. Cianferani, Y. François, S. Fekete, D. Guillaume, V. D'Atri, A. Beck // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2020. – Vol. 184. – P. 113166.
128. Yamano-Adachi, N. Establishment of fast-growing serum-free immortalised cells from Chinese hamster lung tissues for biopharmaceutical production / N. Yamano-Adachi, R. Arishima, S. Puriwat, T. Omasa // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 17612.
129. Bryan, L. The emerging role of cellular post-translational modifications in modulating growth and productivity of recombinant Chinese hamster ovary cells / L. Bryan, M. Clynes, P. Meleady // *Biotechnology Advances*. – 2021. – Vol. 49. – P. 107757.
130. Jayapal, K. P. Recombinant Protein Therapeutics from CHO Cells - 20 Years and Counting / K. P. Jayapal, K. F. Wlaschin, W.-S. Hu, M. G. S. Yap // *CHO Consortium*. – P. 40–47.
131. Kim, J. Y. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential / J. Y. Kim, Y.-G. Kim, G. M. Lee // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2012. – Vol. 93. – № 3. – P. 917–930.

132. Lai, T. Advances in Mammalian cell line development technologies for recombinant protein production / T. Lai, Y. Yang, S. K. Ng // *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland). – 2013. – Vol. 6. – № 5. – P. 579–603.
133. Huang, Y.-M. Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment / Y.-M. Huang, W. Hu, E. Rustandi, K. Chang, H. Yusuf-Makagiansar, T. Ryll // *Biotechnology Progress*. – 2010. – Vol. 26. – № 5. – P. 1400–1410.
134. El-Maï, N. Engineering a human-like glycosylation to produce therapeutic glycoproteins based on 6-linked sialylation in CHO cells / N. El Maï, S. Donadio-Andréi, C. Iss, V. Calabro, C. Ronin // *Methods in Molecular Biology*. – 2013. – Vol. 988. – P. 19–29.
135. Boeger, H. Structural basis of eukaryotic gene transcription / H. Boeger, D.A. Bushnell, R. Davis, J. Griesenbeck, Y. Lorch, J.S. Strattan, K.D. Westover, R.D. Kornberg // *FEBS letters*. – 2005. – Vol. 579. – № 4. – P. 899–903.
136. Bandaranayake, A. D. Recent advances in mammalian protein production / A. D. Bandaranayake, S. C. Almo // *FEBS letters*. – 2014. – Vol. 588. – № 2. – P. 253–260.
137. Lewis, N. E. Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome / N.E. Lewis, X. Liu, Y. Li, H. Nagarajan, G. Yerganian, E. O'Brien, A. Bordbar, A.M. Roth, J. Rosenbloom, C. Bian, M. Xie, W. Chen, N. Li, D. Baycin-Hizal, H. Latif, J. Forster, M.J. Betenbaugh, I. Famili, X. Xu, J. Wang, B.O. Palsson // *Nature Biotechnology*. – 2013. – Vol. 31. – № 8. – P. 759–765.
138. Restelli, V. The effect of dissolved oxygen on the production and the glycosylation profile of recombinant human erythropoietin produced from CHO cells / V. Restelli, M.-D. Wang, N. Huzel, M. Ethier, H. Perreault, M. Butler // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2006. – Vol. 94. – № 3. – P. 481–494.
139. Liu, L. Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins / L. Liu // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2015. – Vol. 104. – № 6. – P. 1866–1884.

140. Butler, M. The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering / M. Butler, M. Spearman // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2014. – Vol. 30. – P. 107–112.
141. Wurm, F. M. Cloning of CHO Cells, Productivity and Genetic Stability—A Discussion / F. M. Wurm, M. J. Wurm // *Processes*. – 2017. – Vol. 5. – № 2. – P. 20.
142. Wurm, M. J. Naming CHO cells for bio-manufacturing: Genome plasticity and variant phenotypes of cell populations in bioreactors question the relevance of old names / M. J. Wurm, F. M. Wurm // *Biotechnology Journal*. – 2021. – Vol. 16. – № 7. – P. e2100165.
143. Lee, J. S. Mitigating Clonal Variation in Recombinant Mammalian Cell Lines / J.S. Lee, H.F. Kildegaard, N.E. Lewis, G.M. Lee // *Trends in Biotechnology*. – 2019. – Vol. 37. – № 9. – P. 931–942.
144. O’Flaherty, R. Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing / R. O’Flaherty, A. Bergin, E. Flampouri, L.M. Mota, I. Obaidi, A. Quigley, Y. Xie, M. Butler // *Biotechnology Advances*. – 2020. – Vol. 43. – P. 107552.
145. Welch, J. T. Considering ‘clonality’: A regulatory perspective on the importance of the clonal derivation of mammalian cell banks in biopharmaceutical development / J. T. Welch, N. S. Arden // *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*. – 2019. – Vol. 62. – P. 16–21.
146. Brown, A. J. Transcriptome-Based Identification of the Optimal Reference CHO Genes for Normalisation of qPCR Data / A. J. Brown, S. Gibson, D. Hatton, D. C. James. – Text : electronic // *Biotechnology Journal*. – 2018. – Vol. 13. – № 1. – URL: <https://eprints.whiterose.ac.uk/120973/3/Transcriptome%20based%20identification%20of%20the%20optimal%20reference%20CHO%20genes%20%281%29.pdf> (accessed 5 February 2022).
147. Gupta, S. K. Metabolic engineering of CHO cells for the development of a robust protein production platform / S.K. Gupta, S.K. Srivastava, A. Sharma, V.H.H. Nalage, D. Salvi, H. Kushwaha, N.B. Chitnis, P. Shukla // *PloS One*. – 2017. – Vol. 12. – № 8. – P. e0181455.

148. Mulukutla, B. C. Regulation of Glucose Metabolism - A Perspective From Cell Bioprocessing / B.C. Mulukutla, A. Yongky, T. Le, D.G. Mashek, W.-S. Hu // Trends in Biotechnology. – 2016. – Vol. 34. – № 8. – P. 638–651.
149. Rogatzki, M. J. Lactate is always the end product of glycolysis / M.J. Rogatzki, B.S. Ferguson, M.L. Goodwin, L.B. Gladden // Frontiers in Neuroscience. – 2015. – Vol. 9. – P. 22.
150. Tsao, Y.-S. Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism / Y.-S. Tsao, A.G. Cardoso, R.G.G. Condon, M. Voloch, P. Lio, J.C. Lagos, B.G. Kearns, Z. Liu // Journal of Biotechnology. – 2005. – Vol. 118. – № 3. – P. 316–327.
151. Moore, A. Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch cultures / A. Moore, J. Mercer, G. Dutina, C.J. Donahue, K.D. Bauer, J.P. Mather, T. Etcheverry, T. Ryll // Cytotechnology. – 1997. – Vol. 23. – № 1-3. – P. 47–54.
152. Chen, Z.-L. Temperature shift as a process optimization step for the production of pro-urokinase by a recombinant Chinese hamster ovary cell line in high-density perfusion culture / Z.-L. Chen, B.-C. Wu, H. Liu, X.-M. Liu, P.-T. Huang // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2004. – Vol. 97. – № 4. – P. 239–243.
153. Holder, P. G. Reconstitution of Formylglycine-generating Enzyme with Copper (II) for Aldehyde Tag Conversion / P.G. Holder, L.C. Jones, P.M. Drake, R.M. Barfield, S. Bañas, G.W. de Hart, J. Baker, D. Rabuka // The Journal of Biological Chemistry. – 2015. – Vol. 290. – № 25. – P. 15730–15745.
154. Qian, Y. Cell culture and gene transcription effects of copper sulfate on Chinese hamster ovary cells / Y. Qian, S.F. Khattak, Z. Xing, A. He, P.S. Kayne, N.-X. Qian, S.-H. Pan, Z.J. Li // Biotechnology Progress. – 2011. – Vol. 27. – № 4. – P. 1190–1194.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Данное исследование выполнено в рамках разработки биотехнологических препаратов против мукополисахаридоза II и VI типов в отделе молекулярной и клеточной биологии АО «ГЕНЕРИУМ» в 2016–2021 гг.

Автор выражает глубокую признательность своим коллегам и сотрудникам института за помощь в выполнении экспериментальной работы:

- ст. лаборанту Камаевой Марии Николаевне
- ст. лаборанту Пименовой Юлии Николаевне
- лаборанту Бондаревой Елене Владимировне
- ст. науч. сотруднику Кирик Инессе Анатольевне
- науч. сотруднику Бутенко Дарье Игоревне
- науч. сотруднику Филатовой Марии Александровне
- науч. сотруднику Павелко Василию Ивановичу
- рук. отдела молек. биологии и биохимии Анисимову Роману Львовичу
- науч. сотруднику Зариповой Долие Тагировне
- ст. науч. сотруднику Смоловой Ксении Александровне
- ст. науч. сотруднику Пантюшенко Марине Семеновне
- ст. науч. сотруднику Тихонову Роману Владимировичу
- мл. науч. сотруднику Королевой Марии Александровне
- мл. науч. сотруднику Иванову Евгению Сергеевичу
- дир. департ. технологических разработок Морозову Антону Николаевичу
- нач. лаб. разработки процессов культивирования Яхину Ильдару Ряшитовичу

Автор выражает искреннюю признательность коллегам отдела интеллектуальной собственности за помощь в оформлении патентной заявки:

- руководителю отдела – Завелевой Элине Владимировне,
- главным специалистам – Лапа Анне Михайловне и Мисюриной Ольге Юрьевне.

Особую благодарность автор выражает:

- менеджерам проектов МПС II и VI типов, директору департамента фармацевтического анализа – Шукурову Рахиму Рахманкуловичу и руководителю отдела молекулярной диагностики – Наталье Алексеевне Литвиновой за содействие и поддержку данных исследований в рамках проектов;
- руководителю отдела клеточной биологии – Бадэ Веронике Николаевне, за оказанную помощь при написании статей, описания заявки на патент и ценные советы при планировании и анализе исследований;
- своему научному руководителю, директору департамента генно-инженерных биологических препаратов – Пискунову Александру Александровичу, за важные рекомендации по оформлению статей, описания заявки на патент и всей диссертационной работе в целом;
- вице-президенту по исследованиям и разработкам в АО «Генериум» д.мед.н., профессору – Равилю Авгатовичу Хамитову за возможность проведения всех необходимых экспериментов в компании, за помощь в организации данных исследований и определение основного направления диссертационной работы.