

ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ РЕКОМБІНАНТНОГО ЛЮДСЬКОГО ФОЛІКУЛОСТИМУЛЮЮЧОГО ГОРМОНУ (ФСГ) У СИРОВАТКОВОМУ ТА БЕЗБІЛКОВОМУ КУЛЬТУРАЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

Отрода М. С., Тодоров Я. С.

КШ ім. Ігоря Сікорського, masha.otroda@gmail.com

Вступ. Фолікулостимулюючий гормон (ФСГ) — гетеродимерний глікопротеїновий гормон, що виробляється в передній долі гіпофіза. Складається з альфа і бета нековалентно зв'язаних субодиниць, які містять 92 і 111 амінокислот відповідно. Кожна субодиниця є посттрансляційно модифікованою і несе дві вуглеводні структури. Відмінності в цих структурах призводять до мікрогетерогенності та різних форм молекули, які визначають період напіврозпаду та *in vivo* біологічну активність глікопротеїнів [1]. Відповідно до важливості ролі посттрансляційної модифікації найбільш перспективною виявилася лінія клітин яєчників китайського хом'яка (СНО). Однак, культура клітин ссавців має низку недоліків: складну та трудомістку процедуру культивування, а також низьку продуктивність, що призвело до різних стратегій розвитку виробничого процесу [2]. Одна з таких — заміна середовищ, що містять сироватку, на безбілкові середовища. Це дає кілька переваг: зниження ризику зараження вірусами, пріонами, нижча вартість, спрощена подальша обробка відповідно до меншого вмісту білкових контамінантів [3].

Мета даної роботи — проаналізувати експресію ФСГ в різних культуральних середовищах для досягнення високопродуктивної клітинної лінії.

Матеріали та методи. Методи літературного пошуку: пошук в базах даних (таких як PubMed, Scopus або Web of Science), пошук за допомогою Google Scholar, аналіз бібліографій.

Результати та обговорення. Культури клітин ссавців є поширеними клітинними лініями та містять велику кількість схвалених терапевтичних білкових платформ. Впроваджуються різноманітні стратегії для підвищення достовірності та відтворюваності процесів виробництва. СНО є однією з найбільш перспективних платформ для виробництва рекомбінантного білка, тому багато досліджень було присвячено розробці оптимального середовища для цієї лінії клітин.

Велика кількість біофармацевтичних компаній віддають перевагу застосуванню суспензійної культури високої щільності в безсироваткових, хімічно визначених середовищах, які визначені як економічно ефективні, безпечні та спрощені середовища для подальшої обробки. Gibco™ CD DG44, CD OptiCHO™ і ProCHO™ є деякими поширеними безбілковими середовищами для експресії рекомбінантного білка в клітинах СНО. Прикладами більш спеціалізованих продуктів є Sheff-CHO CD, яке є хімічно визначеним

середовищем без компонентів тваринного походження та білка для посилення виробництва рекомбінантного білка в клітинах СНО [3, 4].

Одне з досліджень чітко показало, що різні клітинні лінії експресують різні рівні мРНК і білка. Результати свідчать про те, що ефект ампліфікації гена в кожній клітинній лінії слід аналізувати незалежно відповідно до властивостей клітинної лінії та культурального середовища. У сукупності адгезивний СНО/dhfr- у сироватці продемонстрував значно нижчу швидкість секреції порівняно з суспензією клітин DG44 у безбілковому середовищі, а rhFSH міг бути більш економічно вироблений клітинною системою DG44 [3].

Середовище, що не містить сироватки, WCM5, було розроблено для широкомасштабного розмноження клітин СНО, які експресують рекомбінантний білок з використанням дигідрофолатредуктази як селективного маркера. Після періоду адаптації ріст клітин і вихід продукту були вищими, спостерігалось 1,9-кратне збільшення експресії білка протягом більш короткого періоду часу, порівняно з тими, які залишалися в середовищі, що містить сироватку [5].

Лінія СНО залежна від закріплення клітиною і потребує адаптації до суспензійної культури. Відомо про вдалі спроби: під час дослідження, проведеного для оцінки функції ФСГ, клітини СНО трансфікували в середовище Ігла, модифіковане Дульбекко, що містить сироватку, і перенесли в середовище Ігла (α-MEM) без сироватки та адаптували в суспензії, а потім шляхом створення стабільного клону для подальших досліджень. Проте дослідження показали, що адаптація — завдання не з легких. У звіті процес адаптації клітин СНО до безсироваткових середовищ показав великий вплив на глікановий профіль експресованого рекомбінантного білка, що зумовило необхідність моніторингу якості продукту на ранніх стадіях процесу розвитку [6].

Відповідно до великої кількості досліджень середовищ, також було розроблено широкий спектр оптимізації процесів. Методи профілювання експресії генів, включаючи DHFR/MTX та/або глутамінсинтетазу, є процедурами оптимізації, які, як повідомляється, використовуються в системі СНО. І навпаки, також було продемонстровано, що клітини, оброблені метотрексатом, втрачають здатність виробляти високу кількість білка, ймовірно, через розриви ланцюгів ДНК, індуковані метотрексатом, окисне пошкодження ДНК і високу нестабільність каріотипу. Крім того, застосування підвищеної дози препарату може призвести до незбалансованої ампліфікації різних сегментів плазмиди та нестабільності каріотипу. Це явище може, у свою чергу, призвести до низької експресії білка, незважаючи на високу ампліфікацію генів. Переконали докази отримання високопродуктивних і стабільних клітинних ліній із системою DHFR/MTX роблять її все ще привабливою для платформ виробництва рекомбінантних білків [3].

Висновки. CHO є однією з найбільш перспективних платформ для виробництва рекомбінантного білка, в тому числі людського фолікулостимулюючого гормону. Для підвищення продуктивності і ефективності виробництва застосовуються різноманітні стратегії, включаючи оптимізацію культуральних середовищ та умов вирощування клітин. Згідно з дослідженнями, безбілкові середовища вважаються більш економічно ефективними та безпечними для виробництва рекомбінантних білків в клітинах CHO. Враховуючи різні властивості клітинних ліній та культуральних середовищ, необхідно аналізувати ефект ампліфікації гена в кожній клітинній лінії незалежно. Завдяки численним дослідом розроблено ефективні середовища для широкомасштабного розмноження клітин CHO, які експресують рекомбінантний білок. Подальші дослідження допоможуть розробити ще більш ефективні умови для створення рекомбінантних продуктів.

Список використаної літератури:

1. Product Monograph Gonal-F Follitropin alfa for Injection. URL: https://medinfo.emdserono.ca/content/dam/web/health-care/biopharma/web/MI/en_CA/docs/gonal-f-english-product-monograph-october-2020.pdf.
2. Dalton A. C., Barton W. A. Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein Science*. 2014. Т. 23, № 5. С. 517–525. URL: <https://doi.org/10.1002/pro.2439>.
3. Comparative Assessment on the Expression Level of Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone (FSH) in Serum-Containing Versus Protein-Free Culture Media / S. H. Jazayeri et al. *Molecular Biotechnology*. 2017. Vol. 59, no. 11-12. P. 490–498. URL: <https://doi.org/10.1007/s12033-017-0037-4>.
4. Kokal S., Liu K. Development of a chemically defined media and a chemically defined feeding strategy for extended growth and enhanced productivity in CHO-K1 and CHO DG44 cultures. ECI Digital Archives. URL: http://dc.engconfintl.org/cellculture_xv/233.
5. Keen M. J., Rapson N. T. Development of a serum-free culture medium for the large scale production of recombinant protein from a Chinese hamster ovary cell line. *Cytotechnology*. 1995. Т. 17, № 3. С. 153–163. URL: <https://doi.org/10.1007/bf00749653>.
6. Highly expressed recombinant human follicle-stimulating hormone from Chinese hamster ovary cells grown in serum-free medium and its effect on induction of folliculogenesis and ovulation / D.-J. Kim та ін. *Fertility and Sterility*. 2010. Т. 93, № 8. С. 2652–2660. URL: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.05.009>.