

УДК 577.2

Стабильная экспрессия рекомбинантного фактора свертывания крови VIII в клетках СНО с использованием амплификации трансгена, инициированной метотрексатом

Н. А. Орлова^{1,2#}, С. В. Ковнир^{1,2#}, И. И. Воробьев^{1*}, А. С. Юрьев², А. Г. Габитов¹,
А. И. Воробьев²

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

²ФГБУ Гематологический научный центр МЗ и СР РФ, 125167, Москва, Новый Зыковский пр., 6А

Авторы внесли равный вклад в данную работу.

*E-mail: ptichman@gmail.com

Поступила в редакцию 30.12.2011 г.

РЕФЕРАТ Больные гемофилией А – наследственным нарушением свертывания крови – нуждаются в регулярном применении препаратов фактора свертывания крови VIII. Рекомбинантный фактор VIII, продуцируемый в клетках линий СНО или ВНК, эквивалентен природному фактору VIII плазмы крови и широко используется в современной клинической практике. Получение биосимилярного рекомбинантного фактора VIII требует создания высокопродуктивной клональной клеточной линии и получения моноклональных антител, пригодных для аффинной очистки продукта. Изучена возможность амплификации трансгенов полноразмерного и делеционного вариантов фактора VIII, встроенных под контролем цитомегаловирусного промотора в геном трансфицированных клеток, под действием метотрексата. Установлено, что уровень секреции делеционного варианта фактора VIII в 6.5 раза выше, чем природного FVIII. Амплификация трансгена позволила удвоить уровень секреции делеционного варианта фактора VIII, продуцируемого в поликлональной клеточной популяции, и получить клональную клеточную линию, стабильно секретирующую делеционный вариант фактора VIII (до 0.52 МЕ/мл) при суспензионном культивировании в среде определенного химического состава, не содержащей продуктов животного происхождения. Получены четыре моноклональных антитела, узнающие тяжелую цепь фактора VIII и пригодные для адсорбции делеционного варианта фактора VIII непосредственно из культуральной среды и последующей элюции биологически активного фактора VIII с выходом более 85%. Полученные линия-продуцент и моноклональные антитела могут использоваться для разработки схемы промышленного культивирования и очистки рекомбинантного фактора VIII. В дальнейшем планируется получить более продуктивные клеточные линии при помощи не-вирусных промоторов и укороченной кДНК фактора VIII.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА фактор свертывания крови VIII, фактор свертывания крови VIII с делетированным доменом В, гемофилия А, системы гетерологичной экспрессии рекомбинантных белков.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ FVIII – фактор свертывания крови VIII; rhFVIII – рекомбинантный FVIII человека; BDD-FVIII – FVIII с делецией домена В; MTX – метотрексат; EMCV – вирус энцефаломиокардита; IRES – внутренний сайт связывания рибосомы; DHFR – дигидрофолатредуктаза [КФ 1.5.1.3]; МЕ – международная единица (соответствует содержанию фактора VIII в 1 мл пулированной донорской плазмы); мкАт – моноклональное антитело; ОРС – открытая рамка считывания; PBS – фосфатно-солевой буфер.

ВВЕДЕНИЕ

Фактор VIII свертывания крови (FVIII) – это неэнзиматический кофактор фактора IXa, который при протеолитической активации образует с фактором IXa плотный нековалентный комплекс, связывающий и активирующий фактор X. Этот комплекс является основным элементом петли положительной обратной связи в каскаде свертывания крови. Дефекты гена FVIII могут приводить к развитию гемофилии А – X-сцепленного рецессивного генетического заболевания, которое встречается примерно у одного из 5000 мужчин.

При гемофилии А эффективна только регулярно проводимая заместительная терапия. Традиционный источник фактора VIII – это плазма донорской крови, количество которой ограничено, а использование в качестве сырья для получения терапевтических белков связано с риском передачи вирусных [1, 2] и прионных [3] инфекций даже после тщательного скрининга заготовленной плазмы и множественных процедур вирус-инактивации. Рекомбинантный фактор VIII человека (rhFVIII) можно экспрессировать в культивируемых клетках млекопитающих, очистить до фармакопейных показателей посредством аффинной хроматографии и трех-четырёх стадий обычной хроматографии, подвергнуть вирус-инактивации при помощи обработки детергентом и растворителем, а также наночистки или прогревания. Варианты rhFVIII, допущенные к медицинскому применению, получены с использованием культур клеток яичника китайского хомячка (CHO) или почки новорожденного хомяка (ВНК), они полностью эквивалентны FVIII из донорской плазмы при проведении заместительной терапии.

Основной недостаток существующих методов получения rhFVIII – крайне низкий уровень экспрессии целевого белка, обусловленный его большим размером и сложным набором посттрансляционных модификаций. Природный FVIII человека – гликопротеин с молекулярной массой 170–280 кДа, в основном циркулирующий в кровотоке в форме нековалентного комплекса со своим шапероном – фактором Виллебранда (vWF); концентрация FVIII в плазме составляет около 400 нг/мл. FVIII синтезируется в печени в виде одноцепочечного полипептида, состоящего из доменов A1-A2-B-A3-C1-C2. Зрелый секреторный белок подвергается протеолитическому расщеплению в области между доменами B и A3 и образует гетеродимер, состоящий из тяжелой (домены A1-A2-B, 90–200 кДа) и легкой цепи (домены A3-C1-C2, 80 кДа) [4]. При удалении домена B, составляющего значительную часть молекулы FVIII, удельная прокоагулянтная активность FVIII и его период полураспада в плазме крови практически не снижаются [5].

Замена домена B на короткий линкерный пептид, названный SQ, приводит к существенному повышению продукции FVIII в клетках CHO и полному протеолитическому процессингу белка-предшественника до зрелой двухцепочечной формы [6]. Препарат фактора VIII с делецией домена B (BDD-FVIII) допущен к медицинскому применению под торговым названием «Рефакто»; показатели его эффективности и безопасности сопоставимы с показателями препаратов полноразмерного rhFVIII [7].

В настоящей работе получена линия клеток, секретирующих rhFVIII в существенных количествах, и моноклональные антитела (мкАт), пригодные для аффинной очистки rhFVIII. Вследствие того, что клеточные линии с высоким уровнем продукции FVIII, содержащие в геноме единственную вставку трансгена FVIII, не описаны, нами оценена эффективность плазмидных векторов, кодирующих полноразмерный FVIII или BDD-FVIII и пригодных для амплификации генетической кассеты в геноме стабильно трансфицированных клеток. Типичный уровень продукции BDD-FVIII клетками линии CHO после амплификации трансгена под действием метотрексата составлял 0.5–1 МЕ/мл по данным [6]; сходный уровень – 0.5–2 МЕ/(1 млн клеток в день), зафиксирован в независимо проведенной работе [8] у наилучшего клонального продуцента BDD-FVIII.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Создание экспрессионных конструкций

Плазмиду pOptivec/F8 конструировали с использованием вектора pOptivec, полученного путем рециркуляризации линейного вектора pOptivec-TOPO («Invitrogen», США). Плазмиду pOptivec расщепляли эндонуклеазой NotI и лигировали с фрагментом NotI–NotI плазмиды pCMV6-XL4/NM_000132, содержащей полноразмерную кДНК фактора VIII человека («Origene», США). Использовали эндонуклеазы рестрикции и ферменты нуклеинового обмена производства «Fermentas» (Литва) или «СибЭнзим» (Россия).

Для создания плазмиды BDD-FVIII методом ПЦР с использованием праймеров O1KpnIfor, O1Hindrev и O2Hindfor, O2B1prev соответственно (табл. 1) получены фрагменты F1 (479 п.н.) и F2 (933 п.н.), фланкирующие область делеции. Олигонуклеотиды были синтезированы ЗАО «Евроген» (Россия). ПЦР проводили при помощи смеси Tersus polymerase mix (ЗАО «Евроген») на приборе PTC-100 Thermal Cycler («MJ Reseach», США). Очищенные ПЦР-продукты клонировали в вектор pAL-TA («Евроген»), полностью секвенировали области вставки с использованием набора BigDye Terminator v. 3.1 cycle sequencing

Таблица 1. Праймеры, использованные для создания делеционного мутанта FVIII-SQ BDD*

Праймер	Нуклеотидная последовательность
O1KpnIfor	5' <u>GCTGGTACCT</u> CACAGAGAATA-TACA3'
O1HindIIIrev	5' <u>GGAGAAGCTTCT</u> TGGTTCAATG3'
O2HindIIIfor	5' <u>CCAAGCTTCT</u> CCAAAACCCACCA-GTCTTGAAC3'
O2BpIrev	5' <u>CTGCCCATGCTGAGC</u> AGATAC3'
Odelf	5' <u>GCCACA</u> ACTCAGACTTTTCG3'
8sq4f	5' <u>TGTATTTGATGAGA</u> ACCGAAGC3'
8sq5r	5' <u>GCCACTCTGAGCC</u> CTGTT3'
CMVfor	5' <u>CGCAAATGGGCGG</u> TAGGCGTG3'
8sq15r	5' <u>GAGTTCTTTGTTTCTG</u> AGTGCC3'

*Сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции подчеркнуты.

kit («Applied Biosystems», США) и капиллярного секвенатора ABI PRISM 3730 genetic analyzer («Applied Biosystems»). Данные анализировали при помощи программы Chromas 1.45 («Technelysium Pty Ltd.», Австралия).

Фрагмент F3 целевого гена, соответствующий N-концевой части FVIII, получали рестрикцией плазмиды pCMV6-XL4/NM_000132 эндонуклеазами NotI и KpnI. Сборку фрагментов F1–F3 проводили в векторе pAL-TA с образованием плазмиды pALTA/F123. Для ПЦР-анализа колоний использовали специфичный праймер Odelf и вектор-специфичные праймеры M13for и M13rev.

BpI–BpI-фрагмент плазмиды pOptivec/F8 заменяли фрагментом BpI–BpI плазмиды pALTA/F123 и получали экспрессионную плазмиду pOptivec/F8BDD. ПЦР-анализ колоний вели с использованием двух пар специфических праймеров 8sq4f, 8sq5r и CMVfor, 8sq15r. Открытые рамки считывания (ОРС) полноразмерного FVIII и делеционного варианта BDD-FVIII, а также области основных функциональных элементов экспрессионных конструкций (промотора, участка IRES, терминатора транскрипции) секвенировали с использованием праймеров, приведенных в табл. 2.

Плазмидные ДНК для трансфекции нарабатывали в клетках *Escherichia coli* (штамм Stb14, #11635018 «Invitrogen»), трансформированных экспрессионными конструкциями. Клетки культивировали в 0.5 л среды ТВ в течение 18 ч, и выделяли плазмиды с использованием набора EndoFree Plasmid MaxiKit («Qiagen», США) по протоколу фирмы-производителя. При получении стабильно транс-

Таблица 2. Праймеры, использованные для секвенирования открытой рамки считывания FVIII

Праймер	Нуклеотидная последовательность
8sq1f	TGATCAGACCAGTCAAAGGGA
8sq2f	GATTGGATGCCACAGGA
8sq3f	GCCCTCAGCGGATTGGT
8sq4f	TGTATTTGATGAGAACCGAAGC
8sq5f	TGCCATTGAACCAAGAAGC
8sq6f	GAGAAACTGGGGACAACCTGC
8sq7f	AGAAAGACTCACATTGATGGCC
8sq8f	ACAAAGTGGTAGTAGGAAAGGGTG
8sq9f	TGAAACAATTCAGACTCCCCT
8sq10f	GACAAGTGCCACAAATTTCAG
8sq11f	TTTGTCCCTGAACGCTTGT
8sq12f	CAGCCCTTATACCGTGGAG
8sq13f	CAGATGGAAGATCCCCTTT
8sq14f	GGATCAATCAATGCCTGGAG
8sq15f	AGGAGTAATGCCTGGAGACC
8sq1re	GCAAGCCAGGGAGGGAC
8sq2re	TGGCAAACATATTGGTAAAGTA
8sq3re	AGGGGAGTCTGACACTTATTGC
8sq4re	GAGCAAATTCCTGTACTGTCACTT
8sq5re	GCCACTCTGAGCCCTGTT
8sq6re	CTTGGGATTTCCACTCTTCTTT
8sq7re	CTGCTGGAAGATGAGAAGAGTT
8sq8re	TGCTGGCTTGTATTAGGAGA
8sq9re	GCCTTGCCAGAGTTTCAG
8sq10re	AGTCAACAAAGCAGGTCCAT
8sq11re	ACTGTCTATTGCTCCAGGTGA
8sq12re	CTGAGAATGGGAATAGGGTGA
8sq13re	GGGTCAGGCACCGAGGA
8sq14re	GGATGCTTCTTGGCAACTGA
8sq15re	GAGTTCTTTGTTTCTGAGTGCC
IRESArev	AGGTTCCGGGCCCTCACATTG

фицированных линий клеток использовали линеаризованные плазмиды. Продукты рестрикции эндонуклеазой PvuI осаждали этанолом, осадки ДНК растворяли в фосфатно-солевом буфере (PBS) и стерилизовали фильтрацией через 0.22 мкм фильтры («Millipore», США).

Ведение культур клеток

Использовали дефектные по гену *DHFR* клетки CHO DG-44 («Invitrogen»), адаптированные к суспензии

онному культивированию в среде определенного химического состава. Клетки выращивали в колбах Эрленмейера («VWR Scientific», США) в 30 мл среды CD DG-44 («Invitrogen») с добавлением 8 мМ *L*-глутамина («Invitrogen») и 0.18% сурфактанта Pluronic F-68 («BASF Inc.», США), в CO₂-инкубаторе (37°C, 8% CO₂) при перемешивании на орбитальной качалке с постоянной скоростью 130 об/мин. При каждом пассировании измеряли концентрацию клеток и их жизнеспособность с использованием окрашивания трипановым синим. Клетки пассировали каждые 2–3 дня по достижении культурой плотности 1.2×10^6 живых клеток в 1 мл, суспензию клеток разбавляли свежей средой в соотношении 1 : 4.

Трансфекция и селекция стабильно трансфицированных клеток

Трансфекцию проводили при помощи реагента Lipofectamine 2000 («Invitrogen»), не содержащего компонентов животного происхождения; в каждой реакции использовали 18 мкг линейризованной плазмидной ДНК на 1.5×10^7 клеток в 30 мл культуральной среды. После внесения ДНК клетки культивировали в течение 48 ч без смены среды, затем переносили в селективную среду CD OptiCHO («Invitrogen»), не содержащую нуклеозидов, и культивировали до тех пор, пока доля живых клеток не достигала 90% (10–20 дней). Во время культивирования в селекционной среде клетки пассировали 1 раз в 3 дня или до достижения концентрации живых клеток 3×10^5 клеток/мл. Уровень секреции FVIII определяли через 48 ч после начала трансфекции и по окончании культивирования в селективной среде. Трансфекции клеток каждой плазмидой проводили независимо по 3 раза в одинаковых условиях. Поликлональную популяцию клеток (пул), показавшую максимальную продукцию фактора VIII, использовали для амплификации бицистронной генетической кассеты *FVIII-dhfr* под действием метотрексата (MTX).

Создание моноклональных линий-продуцентов

Отобранный пул стабильно трансфицированных клеток культивировали в присутствии возрастающих концентраций MTX в среде CD OptiCHO с 8 мМ *L*-глутамина. На каждом шаге амплификации клетки культивировали в присутствии MTX в течение 10 дней, а затем еще 4–15 дней до достижения доли живых клеток более 90%. Концентрацию секретированного FVIII измеряли при помощи ИФА по окончании каждого шага амплификации, после чего вдвое увеличивали концентрацию MTX и повторяли процедуру еще 9 раз. Пул клеток-продуцентов с максимальным уровнем секреции FVIII использовали для получения

клональных линий-продуцентов методом предельного разведения (0.5 клетки/лунку). Клетки клонировали в условиях адгезионного культивирования в среде CD CHO-A с 8 мМ аланил-глутамина («Invitrogen»), по 200 мкл среды в каждую лунку планшета при 37°C, 5% CO₂ в течение 21 дня. MTX не включали в состав среды при клонировании и не использовали при дальнейшем культивировании.

Рост одиночных колоний наблюдали и документировали на 10-й и 14 дни культивирования. Выросшие колонии переносили в 48-луночные планшеты и при помощи ИФА осуществляли скрининг кондиционированной среды из лунок, содержащих активно растущие колонии. Клональные линии с наилучшими уровнями секреции продолжали растить в адгезионной культуре и затем реадаптировали к условиям суспензионного культивирования в течение трех последовательных пассажей в лунках 24-, 12- и 6-луночных планшетов, используя среду CD OptiCHO с 8 мМ *L*-глутамина. При помощи ИФА проводили скрининг кондиционированной среды из лунок 6-луночных планшетов. Одну выбранную линию продолжали последовательно пассировать в 3, 15, 100 и 200 мл среды CD OptiCHO.

Препаративное культивирование вели в колбах Эрленмейера объемом 500 мл, содержащих по 200 мл культуральной среды. Клетки засеивали в концентрации 2.5×10^5 клеток/мл, культивировали без замены среды до плотности 3×10^6 клеток/мл (4–5 дней), а затем в течение еще 3 дней с ежедневным добавлением 4 мМ *L*-глутамина и 3 мМ глюкозы. Клетки и клеточный дебрис отделяли от кондиционированной среды центрифугированием (500 *g*, 5 мин) с последующей фильтрацией супернатанта при помощи капсульного фильтра с порами 0.22 мкм («Millipore»). Осветленную среду хранили замороженной до использования.

Иммуноферментный анализ

ИФА проводили согласно [9]. ИФА в режиме «связывание антител» использовали для тестирования моноклональных антител (мкАт) к FVIII, антигеном служил концентрат FVIII из донорской плазмы (любезно предоставленный А.Л. Берковским, Гематологический научный центр МЗ и СР РФ) в количестве 200 нг/лунку в PBS. При измерении концентрации FVIII, секретированного в культуральную среду, в качестве подложки использовали поликлональные антитела к FVIII («LifeSpan BioSciences», США) в количестве 50 нг/лунку; в качестве специфичного антитела – мкАт А2, описанное в разделе «Результаты». В качестве стандарта использовали пулированную донорскую плазму в последовательных разведениях в PBS с 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА).

Тестируемые образцы вносили в лунки без разведения или разведенные в PBS с 1% БСА.

Иммуноблоттинг

Лизаты клеток получали при помощи модифицированного буферного раствора RIPA (50 мМ Трис-HCl, pH 7.4; 1% NP-40; 0.25% дезоксихолата натрия, 150 мМ NaCl, 1 мМ Na-EDTA), содержащего смесь ингибиторов протеаз («Sigma», США). Образцы кондиционированной среды осветляли центрифугированием и концентрировали в 30 раз переосаждением трихлоруксусной кислотой. Образцы нормировали по концентрации суммарного белка, вносили в лунки из расчета 10 мкг белка на лунку и разделяли электрофорезом в 7.5% денатурирующем полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ). Перенос на мембрану, блокирование, гибридизацию и проявление окраски проводили согласно [9]. Использовали мембрану Hybond C Extra («GE Healthcare», США), готовый раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина («Sigma»), мкАт А2 для детекции тяжелой цепи FVIII и мкАт производства «Santa Cruz», США для детекции легкой цепи.

Получение мкАт

Иммунизацию, слияние и клонирование гибридом проводили согласно [9]. Самок мышей линии Balb/c («Harlan Labs», Великобритания) иммунизировали подкожно 100 нг рекомбинантного полноразмерного FVIII (Когенейт ФС производства «Bayer HealthCare LLC», США) в 0.25 мл 0.85% NaCl и 0.25 мл полного адъюванта Фрейнда («Pierce Biotechnology», США). Через 2 и 4 недели после первой инъекции повторно вводили 100 нг антигена в неполном адъюванте Фрейнда. Через 1 неделю после последней инъекции отбирали пробы крови из хвостовых вен мышей, и измеряли уровень специфических антител в сыворотке методом ИФА. Одну мышью с максимальным титром IgG использовали для слияния спленоцитов с клетками миеломы SP2/0 при помощи полиэтиленгликоля (ПЭГ). Клетки после слияния выращивали в селективной среде, рассеивали в лунки 96-луночных планшетов и определяли титр IgG к FVIII. Клетки из лунок с положительным сигналом переносили в лунки 24-луночных планшетов и определяли титр специфических IgG и чувствительность к элюции раствором 50% этиленгликоля в PBS. Клетки из лунок с наивысшими титрами и максимальной чувствительностью к элюции этиленгликолем использовали для клонирования гибридом методом предельного разведения (0.5 клетки/лунку). Гибридомные клоны выращивали, повторно проводили скрининг по указанной выше схеме и клонировали. Выращенные гибридомы использовали для получения кондицио-

нированной культуральной среды (10–100 мл) и получения асцитной жидкости в мышах линии Balb/c, предварительно сенсibilизированных введением пристана («Sigma»). Собранную асцитную жидкость замораживали до дальнейшего использования.

мкАт из асцитной жидкости и кондиционированной среды очищали по одинаковому протоколу – преципитация сульфатом аммония, аффинная хроматография на колонке HiTrap Protein G HP («GE Healthcare») объемом 1 мл, концентрирование элюированных IgG ультрафильтрацией и окончательная очистка, совмещенная с обессоливанием, при помощи гель-фильтрации на колонке Superdex 75 10/300 («GE Healthcare») в растворе PBS.

Иммуносорбенты получали при помощи смолы NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow («GE Healthcare») по инструкции производителя. Связывание антигена проводили методом адсорбции в объеме, для этого аликвоты кондиционированной среды объемом 1 мл в микроцентрифужных пробирках смешивали с аликвотами (0.1 мл) суспензии иммуносорбентов в PBS и инкубировали при перемешивании в течение 1 ч при комнатной температуре. Иммуносорбенты осаждали центрифугированием в течение 15 с, супернатанты обедненной культуральной среды собирали для дальнейшего анализа. Сорбенты промывали тремя порциями по 1 мл PBS, связавшиеся белки элюировали, добавляя 0.15 мл 50% раствора этиленгликоля в PBS и инкубируя в течение 5 мин.

Коагулометрия

Прокоагулянтную активность FVIII определяли при помощи оптического коагулометра ThromboScreen 400c («Pacific Hemostasis», США) и набора реагентов «Фактор VIII-тест» (НПО «Ренам», Россия) в соответствии с протоколом производителя набора с некоторыми изменениями. Образцы культуральной среды разводили перед проведением анализа имидазоловым буферным раствором, элюаты с аффинных колонок разводили в 10–50 раз имидазоловым буферным раствором с 1% БСА. При тестировании образцов культуральной среды к образцу калибровочной плазмы крови добавляли 10% кондиционированной среды, полученной на культуре нетрансфицированных клеток. При тестировании элюатов к образцам калибровочной плазмы крови добавляли 2–10% раствора для элюции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессионная конструкция рOptivec/F8, кодирующая полноразмерный фактор VIII, была создана на основе вектора рOptivec-ТОРО. Стратегия клонирования делеционного варианта – SQ-мутеина с делетированным В-доменом, основана на мини-

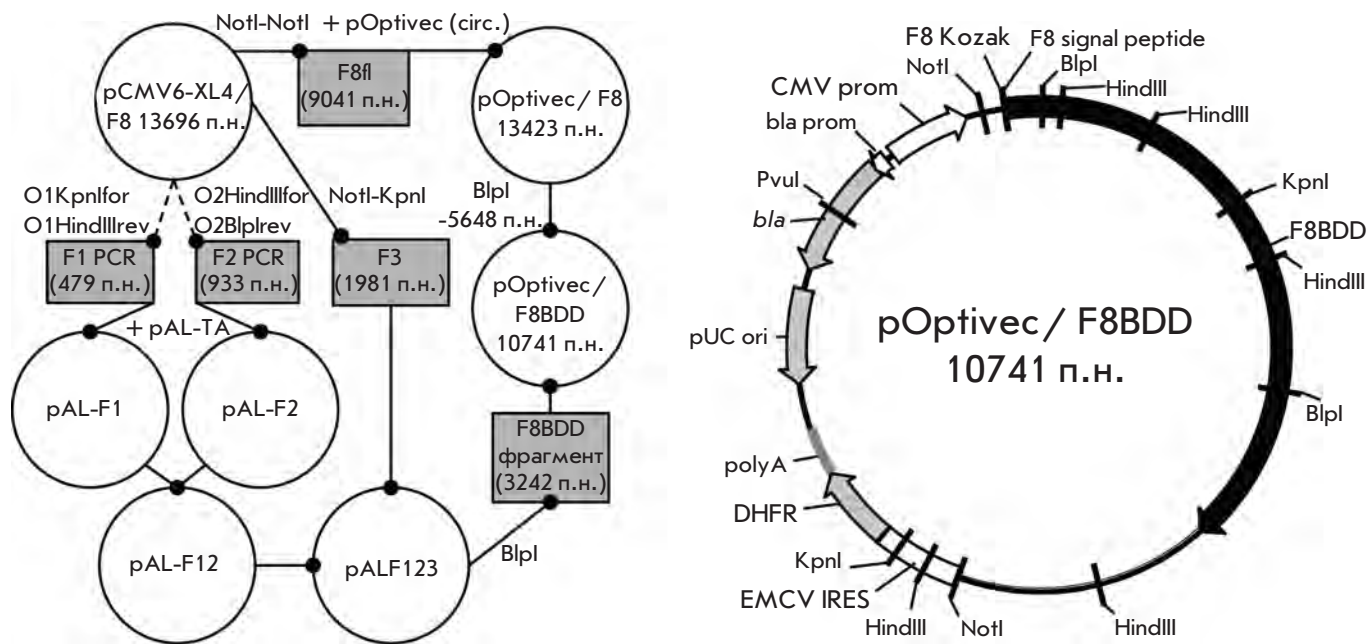


Рис. 1. Общая схема клонирования и карта экспрессионной плазмиды pOptivec/F8BDD. Линейные фрагменты ДНК изображены в виде прямоугольников, плазмиды – кругов. Стадии ПЦР (PCR) показаны пунктирной линией, стадии рестрикции-лигирования – сплошной. CMV prom – цитомегаловирусный промотор, F8 Kozak – природная последовательность Козак гена FVIII, F8 signal peptide – последовательность, кодирующая природный сигнальный пептид FVIII, F8BDD – OPC SQ-варианта фактора VIII с делетированным доменом B, EMCV IRES – внутренний участок связывания рибосома вируса энцефаломиокардита, DHFR – OPC дигидрофолатредуктазы, polyA – сигнал полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота, pUC ori – бактериальная область начала репликации, bla – OPC β-лактамазы, bla prom – промотор гена β-лактамазы. Направление транскрипции генов указано стрелками. Обозначены сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции, использованных при клонировании.

мальном использовании ПЦР для уменьшения вероятности возникновения мутаций. Два коротких ПЦР-продукта, F1 и F2, фланкирующих область делеции, клонировали независимо, а затем соединили с фрагментом F3, полученным рестрикцией плазмиды pCMV6-XL4/NM_000132 и соответствующим N-концевой части FVIII. Для получения экспрессионной конструкции pOptivec/F8BDD фрагмент BlnI-BlnI плазмиды pOptivec/F8, кодирующей полно-размерный белок, заменили BlnI-BlnI-фрагментом сборки F1-F2-F3 (рис. 1).

Получена экспрессионная конструкция, содержащая CMV-промотор, последовательность Козак природного гена фактора FVIII, OPC BDD-FVIII, IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV), обеспечивающий 5'-кеп-независимую инициацию трансляции, OPC дигидрофолатредуктазы мыши, позволяющей проводить отбор стабильно трансфицированных клеток в селективной среде и последующую амплификацию кассеты FVIII-IRES-dhfr в геноме клеток, об-

работанных МТХ. Для получения стабильных линий использовали линейаризованные плазмиды с разрушенным иррелевантным геном β-лактамазы.

Получение линии-производителя

Дефектные по DHFR клетки CHO DG-44 трансфицировали линейаризованными экспрессионными плазмидами в бессывороточной среде с использованием реагента, свободного от продуктов животного происхождения. Эффективность трансфекции определяли при помощи контрольной плазмиды, кодирующей усиленный зеленый флуоресцентный белок (eGFP) под контролем промотора CMV. От 10 до 20% клеток экспрессировали ген eGFP через 48 ч после начала трансфекции, при этом более 85% клеток были жизнеспособными. Проводили по три независимых трансфекции каждой плазмидой, кодирующей FVIII. Пулы стабильно трансфицированных клеток получены во всех случаях в результате культивирования трансфицированных клеток в селективной среде

Таблица 3. Секретия BDD-FVIII 10 наиболее продуктивными клональными клеточными линиями

Клональная линия, номер	18	22	17	9	1	2	15	3	4	16
Секретируемый BDD-FVIII, МЕ/л*	502	475	434	416	410	399	395	379	378	375

*Концентрацию секретированного продукта измеряли для прикрепленных культур в момент достижения конfluenceности.

в течение 15–20 дней. Концентрацию секретированного FVIII определяли методом ИФА. Она составила менее 10 МЕ/л в случае всех трех пулов, секретирующих полноразмерный FVIII. Обнаружен пул с уровнем секретии BDD-FVIII 71 ± 10 МЕ/л, который использовали для амплификации трансгена.

Клетки выбранного пула обрабатывали МТХ, начиная с концентрации 25 нМ. После стабилизации культуры, определенной как возрастание доли живых клеток выше 85%, концентрацию МТХ удваивали и продолжали амплификацию (рис. 2). Не обнаружено плавного подъема уровня секретии BDD-FVIII в течение всего курса амплификации, максимальный уровень BDD-FVIII в кондиционированной среде получен после пяти последовательных шагов амплификации (0.5 мкМ МТХ). Дальнейшее увеличение концентрации МТХ привело к немедленному падению уровня секретии продукта в 10 раз с последующим возвращением к величинам, примерно соответствующим исходной культуре стабильно трансфицированных клеток (74 ± 6 МЕ/л для 16 мкМ МТХ). Это явление предположительно обусловлено увеличением в популяции доли непродуцирующих клеток, содержащих измененную бицистронную мРНК [10] или амплифицированные «посторонние» гены, например ген множественной

лекарственной устойчивости, кодирующий гликопротеин Р [11].

Пул клеток с максимальным уровнем продукции BDD-FVIII, полученным в присутствии 0.5 мкМ МТХ, использовали для клонирования клеток-продуцентов методом предельного разведения. В лунках, содержащих единичные колонии, обнаружили 22 клон, секретирующих, согласно данным ИФА, целевой белок. Клональные линии подращивали в условиях адгезионного культивирования до количества 10^6 клеток, после чего определяли концентрацию секретируемого BDD-FVIII (табл. 3). Культивирование четырех клональных линий с максимальным уровнем продукции целевого белка было продолжено в условиях суспензионной культуры; концентрацию BDD-FVIII в кондиционированной среде определяли повторно после трех и 10 последовательных пассажей (10 и 30 дней непрерывного культивирования). Не зафиксировано существенного падения уровня BDD-FVIII в двух клональных линиях, № 18 и № 22, (данные не приведены), более продуктивную линию № 18 выбрали для дальнейшего использования.

Нами охарактеризован секретируемый BDD-FVIII из кондиционированной среды и клеточных лизатов отобранной клональной линии, названной DG-BDD-FVIII-18. Согласно данным иммуноблотинга (рис. 3),

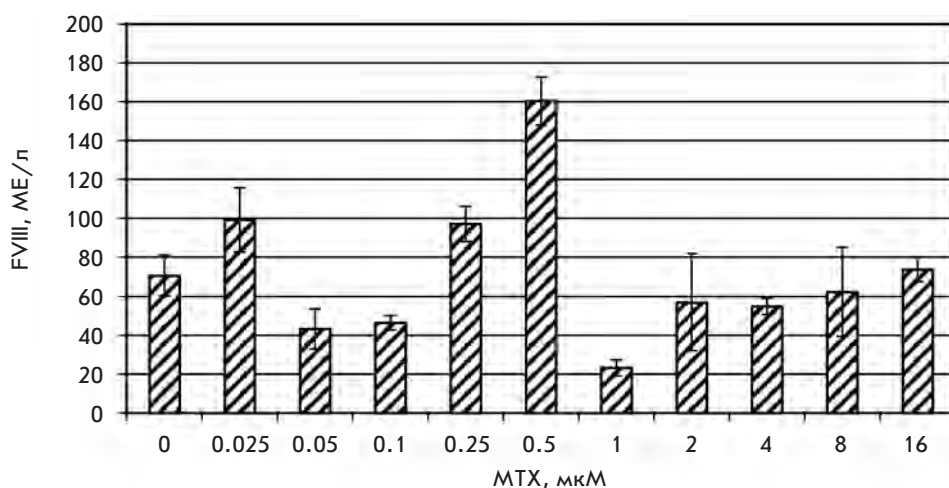


Рис. 2. Уровень секретии BDD-FVIII в конfluenceнтных клеточных популяциях по данным ИФА. Измерения проводили в двух повторностях, погрешности указаны для доверительных интервалов 95%.

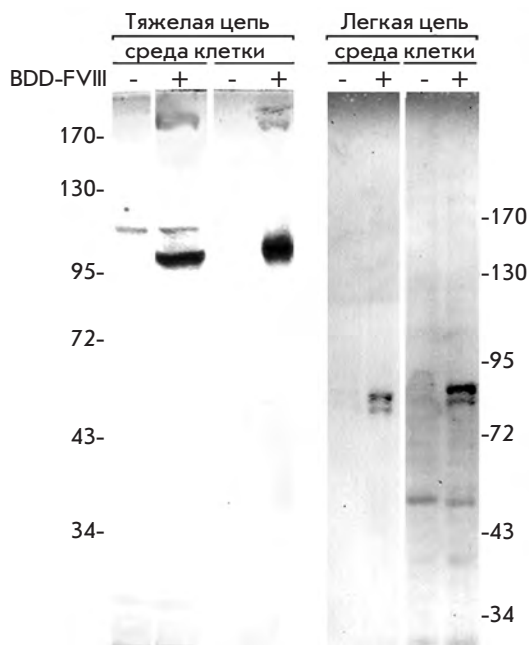


Рис. 3. Иммуноблотинг секретированного и внутриклеточного BDD-FVIII. «тяжелая цепь» и «легкая цепь» – гибридизация с моноклональными антителами к тяжелой и легкой цепи FVIII соответственно; «BDD-FVIII-» и «BDD-FVIII+» – образцы, соответствующие нетрансфицированным клеткам CHO DG-44 и клеткам линии DG-BDDFVIII-18 соответственно. Приведенные для каждого из антител дорожки соответствуют одной мембране, разделение в 7.5% ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях, молекулярные массы указаны в кДа.

основная часть секретированного BDD-FVIII и его внутриклеточного белка-предшественника была процессирована до двухцепочечной формы. Небольшое количество одноцепочечной формы обнаруживалось только при использовании моноклонального антитела против тяжелой цепи. Продукты протеолитической деградации не выявлялись обоими антителами, что указывает на достаточно высокую протеолитиче-

скую стабильность целевого белка в использованной культуральной среде. Подвижность полос тяжелой и легкой цепи при ДСН-ПААГ соответствовала подвижности цепей BDD-FVIII, определенной ранее [12].

Прокоагулянтную активность BDD-FVIII в кондиционированной среде измеряли по способности уменьшать время свертывания субстратной плазмы крови больных гемофилией А в тесте активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Активность FVIII в проанализированной культуральной среде равна 0.47 МЕ/мл, а уровень антигена FVIII в этом образце, измеренный при помощи ИФА, составил 0.52 МЕ/мл. Таким образом FVIII, секретируемый клональной клеточной линией DG-BDD-FVIII-18, обладает полной удельной прокоагулянтной активностью.

Промышленная очистка белка BDD-FVIII включает в себя четыре стадии обычной хроматографии и одну стадию аффинной хроматографии [13]. Таким образом, ключевым компонентом всего процесса может быть мкАт, способное связывать BDD-FVIII из культуральной среды или из промежуточного концентрата и диссоциировать в мягких условиях элюции. Типичным раствором, пригодным для элюции FVIII с иммуноаффинных колонок, является раствор 50% этиленгликоля в PBS [14].

Моноклональные антитела, пригодные для аффинной очистки BDD-FVIII, получены путем скрининга гибридомных клонов (продуцирующих антитела к FVIII) при помощи ИФА. Лунки с комплексами антиген-антитело трижды промывали раствором, содержащим 50% этиленгликоля, а контрольные лунки – раствором PBS-Твин. В целевых клонах гибридом должно было наблюдаться максимальное снижение уровня сигнала при промывке раствором этиленгликоля. Из 34 клонов гибридом, полученных после одного слияния спленоцитов мыши, иммунизированной FVIII, были отобраны четыре клона с высоким титром специфических антител и максимальной чувствительностью к промывке лунок раствором этиленгликоля (табл. 4).

Таблица 4. Свойства моноклональных антител, чувствительных к этиленгликолю

Клон	Титр мкАт в асцитной жидкости	Падение сигнала в ИФА при промывке этиленгликолем, %	Динамическая емкость сорбента, МЕ/мл	Степень элюции FVIII, %
A2	1 : 123 000	40	2.6	89
E3	1 : 68 500	39	2.8	89
A4	1 : 27 500	15	1.6	>90
B6	1 : 123 000	35	3.4	86

Все четыре отобранных мкАт избирательно связывались с тяжелой цепью BDD-FVIII при иммуноблоттинге (данные не приведены), т.е. узнаваемые этими антителами эпитопы находятся вне домена В. Очищенные мкАт, полученные из асцитной жидкости, были иммобилизованы на активированном N-гидроксисукцинимидом хроматографическом сорбенте в соотношении 1 мг мкАт на 1 мл осажденного сорбента. Полученные иммуносорбенты использовали для выделения BDD-FVIII непосредственно из кондиционированной среды методом адсорбции в объеме. В таких условиях наблюдалась неполная адсорбция BDD-FVIII (около 20–30%), но практически весь адсорбированный целевой белок удерживался на сорбенте при промывке PBS и элюировался 50% раствором этиленгликоля. Уровень FVIII во фракции несвязавшихся белков и во фракциях элюатов измеряли при помощи коагулометрического теста. Присутствие активного FVIII во фракциях элюата указывало на то, что в использованных условиях элюции не происходит существенного повреждения продукта. Таким образом, получены мкАт, потенциально пригодные для препаративной иммуноаффинной очистки рекомбинантного FVIII.

ВЫВОДЫ

Цель работы состояла в создании стабильной клеточной линии, продуцирующей рекомбинантный FVIII, и в получении моноклональных антител для иммуноаффинной очистки целевого белка.

Для этого были получены экспрессионные конструкции, содержащие кДНК, кодирующие полноразмерный FVIII человека и его вариант BDD-FVIII (с делецией домена В). Правильность нуклеотидной последовательности кодирующих областей была подтверждена полным секвенированием области вставки. При получении популяций стабильно

трансфицированных клеток установлено, что уровень секреции целевого белка значительно выше при трансфекции конструкцией, кодирующей BDD-FVIII. Этот вариант стабильно трансфицированных клеток использовали для амплификации трансгена под действием метотрексата и последующего клонирования клеток-продуцентов. Создана клональная линия-продуцент DG-BDDFVIII-18, уровень секреции BDD-FVIII в которой составляет 500 МЕ/л. Целевой белок в кондиционированной среде обладал биологической активностью и был представлен преимущественно зрелой двухцепочечной формой. Линия-продуцент была получена без использования веществ животного происхождения, она поддерживается в суспензионных условиях культивирования в ростовой среде определенного химического состава. Получены также моноклональные антитела, направленные против тяжелой цепи BDD-FVIII и пригодные для иммуноаффинной очистки нативного целевого белка.

Таким образом, созданы оба основных компонента, необходимые для промышленного получения рекомбинантного FVIII – клональная линия-продуцент, не контактировавшая с веществами животного происхождения, и моноклональные антитела для аффинной очистки продукта. В дальнейшем планируется создать более продуктивные клональные клеточные линии и разработать процесс получения FVIII. ●

Секвенирование ДНК проводили в Межинститутском центре коллективного пользования «ГЕНОМ» ИМБ РАН, организованном при поддержке РФФИ.

Работа выполнена при поддержке грантов правительства Москвы № 8/3-330н-08, 8/3-332н-08, 8/3-125н-09.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Blumel J., Schmidt I., Effenberger W., Seitz H., Willkommen H., Brackmann H.H., Lower J., Eis-Hubinger A.M. // *Transfusion*. 2002. V. 42. № 11. P. 1473–1481.
- Yokozaki S., Fukuda Y., Nakano I., Katano Y., Toyoda H., Takamatsu J. // *Blood*. 1999. V. 94. № 10. P. 3617.
- Evatt B.L. // *Haemophilia*. 1998. V. 4. № 4. P. 628–633.
- Thompson A.R. // *Semin. Thromb. Hemost.* 2003. V. 29. № 1. P. 11–22.
- Pittman D.D., Alderman E.M., Tomkinson K.N., Wang J.H., Giles A.R., Kaufman R.J. // *Blood*. 1993. V. 81. № 11. P. 2925–2935.
- Lind P., Larsson K., Spira J., Sydow-Backman M., Almstedt A., Gray E., Sandberg H. // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 232. № 1. P. 19–27.
- Kessler C.M., Gill J.C., White G.C., Shapiro A., Arkin S., Roth D.A., Meng X., Lusher J.M. // *Haemophilia*. 2005. V. 11. № 2. P. 84–91.
- Chun B.H., Park S.Y., Chung N., Bang W.G. // *Biotechnol. Lett.* 2003. V. 25. № 4. P. 315–319.
- Harlow E., Lanes D. *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1988. 726 p.
- Fann C.H., Guirgis F., Chen G., Lao M.S., Piret J.M. // *Biotechnol. Bioeng.* 2000. V. 69. № 2. P. 204–212.
- Assaraf Y.G., Molina A., Schimke R.T. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 31. P. 18326–18334.
- Kelley B.D., Booth J., Tannatt M., Wub Q.L., Ladner R., Yuc J., Potter D., Ley A. // *J. Chromatogr. A*. 2004. V. 1038. № 1–2. P. 121–130.
- Kelley B., Jankowski M., Booth J. // *Haemophilia*. 2010. V. 16. № 5. P. 717–725.
- Griffith M. // *Ann. Hematol.* 1991. V. 63. № 3. P. 131–137.