

СРАВНЕНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ АФЛИБЕРЦЕПТА, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ CHO И CHO-GS

С.С. Тимонова*, И.А. Кирик, Д.Т. Зарипова, Р.И. Фарсиева, И.А. Каргополов,
Р.Л. Анисимов, А.А. Пискунов, Р.А. Хамитов

АО «ГЕНЕРИУМ»

601125, Российская Федерация, Владимирская обл., Петушинский р-н,
п. Вольгинский, ул. Владимирская, 14

Тип селекционного маркера и условия селекции являются одними из ключевых стадий при получении продуцентов, экспрессирующих рекомбинантные белки. Получение клеточных линий — продуцентов афлиберцепта на основе клеток линии CHO и CHO-GS позволит сравнить и выявить наиболее подходящий вариант клеточной линии для получения препарата. В результате работы получены по 10 моноклональных клеточных линий — продуцентов предполагаемого биоаналога афлиберцепта на клеточных платформах CHO и CHO-GS. Продуктивность на 15 сут периодического культивирования с подпиткой двух групп составила до 2,5 г/л. Наблюдали увеличение удельной клеточной продуктивности продуцентов с использованием платформы CHO-GS. Вывод: применение линии CHO-GS, ауксотрофной по глутамину, более предпочтительно, т. к. сравнимый выход целевого белка достигается при более низкой концентрации жизнеспособных клеток, что благоприятно скажется в дальнейшем на этапах очистки и выделения целевого белка.

Ключевые слова: клетки яичника китайского хомяка, CHO, получение клеточных линий, ауксотрофия по глутамину, афлиберцепт

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: публикация подготовлена в рамках разработки лекарственного препарата афлиберцепт в АО «ГЕНЕРИУМ». публикация подготовлена в рамках разработки лекарственного препарата афлиберцепт в АО «ГЕНЕРИУМ».

Для цитирования: Тимонова С.С., Кирик И.А., Зарипова Д.Т., Фарсиева Р.И., Каргополов И.А., Анисимов Р.Л., Пискунов А.А., Хамитов Р.А. Сравнение продуцентов афлиберцепта, полученных на основе клеточных линий CHO и CHO-GS. *Биомедицина*. 2025;21(1):46–57. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-1-46-57>

Поступила 06.11.2024

Принята после доработки 15.02.2025

Опубликована 10.03.2025

COMPARISON OF AFLIBERCEPT PRODUCERS DERIVED FROM CHO AND CHO-GS CELL LINES

Sofya S. Timonova*, Inessa A. Kirik, Dolia T. Zaripova, Regina I. Farsieva,
Ivan A. Kargopolov, Roman L. Anisimov, Alexander A. Piskunov, Ravil A. Khamitov

GENERIUM

601125, Russian Federation, Vladimir Region, Petushinskiy District, Vol'ginskiy Village, Vladimirska Str., 14

When creating cell lines expressing recombinant proteins, the type of selection marker and selection conditions are of essential importance. In this work, we aim to obtain and compare cell lines based on CHO and CHO-GS as potential aflibercept producers to identify the most suitable cell line for obtaining an aflibercept biosimilar. As a result, 10 monoclonal cell lines-producers of a potential aflibercept

biosimilar were obtained based on CHO and CHO-GS cell platforms. In the two groups, the productivity on the 15th day of periodic cultivation with feeding achieved 2.5 g/L. The CHO-GS group showed an increase in the specific cell productivity of aflibercept producers. The conclusion is made that the CHO-GS glutamine auxotroph line is a more preferable option. This cell line enables a comparable yield of target protein at lower concentrations of viable cells, which has a favorable effect on further stages of purification and isolation of target protein.

Keywords: Chinese hamster ovary cells, CHO, cell line development, glutamine auxotrophic line, aflibercept

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: this publication was prepared as part of the development of the drug aflibercept at GENERIUM JSC.

For citation: Timonova S.S., Kirik I.A., Zaripova D.T., Farsieva R.I., Kargopolov I.A., Anisimov R.L., Piskunov A.A., Khamitov R.A. Comparison of Aflibercept Producers Derived from CHO and CHO-GS Cell Lines. *Journal Biomed.* 2025;21(1):46–57. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-1-46-57>

Submitted 06.11.2024

Revised 15.02.2025

Published 10.03.2025

Введение

Тип селекционного маркера и условия селекции являются одними из ключевых факторов при получении продуцентов, экспрессирующих рекомбинантные белки. В биотехнологии для селекции продуцентов традиционно применяют экспрессионные векторы, содержащие гены, обеспечивающие клетке устойчивость к антибиотикам, например ген неомизин-фосфотрансферазы, который позволяет трансфицированной клетке расти в присутствии антибиотика неомизина.

Вместе с тем существует ряд проблем применения селекции на основе антибиотиков:

1) антибиотики могут изменять экспрессию гена клетки-хозяина, что может повлиять на продуктивность и/или качество продукции [14];

2) могут подавлять рост клеточной культуры и подавлять рост возможной контаминации во время разработки или производства препарата;

3) во время производства рекомбинантного белка использование антибиотика может затруднить последующую очистку и вызовет необходимость дополнительной стадии очистки от его остаточных количеств, что приведет к удорожанию процесса создания препарата в целом;

4) добавление селективного антибиотика в ростовую среду может привести к снижению высоких плотностей клеток и подавлению жизнеспособности культуры;

5) наличие гена устойчивости к антибиотикам может косвенно обусловить снижение количества экспрессируемого белка, поскольку даже в отсутствие селективного агента ген будет транскрибироваться, тем самым способствуя дополнительному стрессовому состоянию клетки во время процесса секреции целевого белка [13];

6) бесконтрольное потребление/применение антибиотиков приводит к появлению резистентности/полирезистентности и новых форм мутировавших бактериальных штаммов-контаминантов [7, 3].

По вышеуказанным причинам органы здравоохранения (FDA, EMEA, ВОЗ) уже рассматривают введение ограничений на использование антибиотиков во время разработки биофармпрепаратов даже на самых ранних этапах и рекомендуют сводить к минимуму их использование, постепенно переходя на новые системы селекции и контроля качества [12].

Таким образом, можно предположить, что в скором времени к биофармацевтической отрасли будут применены новые стандарты производства рекомбинантных белковых препаратов, а именно: генно-

инженерные конструкции должны быть полностью лишены генов устойчивости к антибиотикам в своей структуре. В связи с этим возникает задача по созданию клеточной линии, тип селекции которой не будет связан с антибиотикоустойчивостью [4].

Для соответствия современным требованиям и биобезопасности разработки лекарственных препаратов более рационально использовать систему селекции, основанную на механизмах ауксотрофии и маркерах метаболического пути клетки-хозяина (метаболическая селекция).

Одной из самых популярных мишеней для создания ауксотрофных клеточных линий является глутаминсинтетаза. Глутаминсинтетаза (GS, EC 6.3.1.2) представляет собой фермент, который играет важную роль в метаболизме клетки, катализируя образование глутамина из глутамата и аммиака.

Ранее использовали систему селекции, где продуцентов отбирают под действием L-метионинсульфоксима (MSX). MSX представляет собой низкомолекулярный необратимый ингибитор ферментативной активности GS. Клетки, трансфицированные экзогенным геном GS и геном интереса, культивируются в присутствии возрастающих доз MSX для ингибирования активности GS с целью отбора клонов, продуцирующих целевой белок. Увеличение доз MSX приводило к выживанию клеток, которые имели более высокое число интегрированных экспрессионных кассет, содержащих GS, включая ген интереса [10]. Из недостатков данной системы следует отметить увеличение сроков генерации клеточной линии с повышением содержания ингибирующего агента MSX, а также снижение продуктивности целевого белка при отмене давления MSX, что в совокупности будет приводить к нестабильности продуцентов в дальнейшем [5, 11].

Более перспективным приемом в разработке платформ для получения стабиль-

ных клеточных линий стало получение мутантов с подавлением экспрессии гена GS. Поскольку продуценты могут расти на среде без глутамина, это позитивно сказывается на всем процессе культивирования, поскольку снижается накопление в среде ионов аммония, которые могут быть токсичны для продуцентов [10].

Цель работы заключалась в получении клонов — продуцентов афлиберцепта с использованием двух клеточных линий: CHO и полученной в нашей лаборатории линии CHO-GS, ауксотрофной по глутамину, для сравнения ростовых и продукционных характеристик полученных клеточных культур для двух групп, а также исследование преимуществ использования клеточной линии CHO-GS.

Афлиберцепт представляет собой рекомбинантный гибридный белок, состоящий из фрагмента второго домена рецептора VEGFR1 и третьего домена рецептора VEGFR2, ковалентно связанных с Fc-фрагментом IgG1 человека. Рецептор VEGF обладает тирозинкиназной активностью и активируется сигнальным белком VEGF (от англ. Vascular endothelial growth factor — фактор роста эндотелия сосудов) [2]. Афлиберцепт действует как рецептор-ловушка для лигандов: фактора роста эндотелия сосудов-A (VEGF-A) и фактора роста сосудов плаценты (PlGF) за счет своего строения, тем самым предотвращая связывание этих лигандов с рецепторами эндотелия, VEGFR-1 и VEGFR-2. Строение белка обеспечивает его связывание с большинством факторов роста сосудов: VEGF-A, VEGF-B и PlGF, обеспечивая при этом локальное замедление и/или торможение роста сосудистой ткани. В конечном итоге действие препарата замедляет разрастание сосудов, что используется в офтальмологии для лечения неоваскулярной возрастной дегенерации желтого пятна [8], различных типов отека желтого пятна и диабетической ретинопатии

[9], а также дополнительно в качестве противоопухолевого препарата при различных формах раковых заболеваний [16].

Таким образом, создание отечественных высокотехнологичных препаратов рекомбинантных терапевтических белков, таких как афлиберцепт, на основе клеточной линии, аукоотрофной по глутамину CHO-GS, будет способствовать реализации государственной политики по развитию биофармацевтической отрасли в Российской Федерации и программы импортозамещения.

Материалы и методы

Клеточная линия CHO

Линия CHO-K1 (получена из НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИгенетики), далее — CHO была адаптирована к суспензионному культивированию в среде, не содержащей сыворотку или другие компоненты животного происхождения. Клетки CHO культивировали в среде BalanCD Growth A (“FUJIFILM IRVINE SCIENTIFIC INC”, США) при 37°C, 5% CO₂, влажности более 75% в CO₂-инкубаторе (“Sanyo”, Япония).

Клеточная линия CHO-GS

Адаптированные к бессывороточному культивированию клетки CHO-GS, аукоотрофные по глутамину, культивировали на среде BalanCD Growth A без использования L-глутамин при 37°C, 5% CO₂, влажности более 75% в CO₂-инкубаторе (“Sanyo”, Япония).

Дизайн Zn fingers и сборка плазмид для нокаута глутаминсинтетазы

Работа по сборке плазмид, кодирующих нуклеазы цинковых пальцев (ZFN, Zink Finger Nucleases) pFok+ex5, pFok-ex5, pFok+ex7, pFok-ex7 (табл. 1) для нокаута глутаминсинтетазы, проводилась аналогично протоколу, описанному в [6]. Для этого последовательности цинковых пальцев для внесения разрывов в 5 и 7 экзонах гена глутаминсинтетазы *C. griseus* были подобраны с помощью онлайн-ресурса <http://zifit.partners.org/ZiFiT/ChoiceMenu.aspx>. Кодон-оптимизированные нуклеотидные после-

довательности Fok+/- (<https://www.addgene.org/browse/article/28244338/>) и Zn finger доменов были синтезированы TopGene Technologies (Канада). Последовательности Fok+ и Fok- (<https://www.addgene.org/browse/article/28244338/>) были клонированы в вектор pcDNA3.1 (Invitrogen) по сайтам NheI/ApaI, после чего в полученные конструкции по сайтам XbaI/BamHI были вставлены соответствующие домены цинковых пальцев.

Нокаут гена GS (получение клеточной линии CHO-GS)

Клетки CHO были одновременно трансфицированы плазмидами pFok+ex5, pFok-ex5, pFok+ex7, pFok-ex7 с использованием электропоратора MaxCyte согласно протоколу производителя. Для подтверждения нокаута глутаминсинтетазы был проведен вестерн-блот клеточных лизатов с использованием антител к глутаминсинтетазе согласно протоколу, описанному в работе [15].

Экспрессионные векторы для CHO и CHO-GS, несущие ген белка афлиберцепта

Кодон-оптимизированная для экспрессии в CHO последовательность афлиберцепта, синтезированная TopGene Technologies (Канада), была клонирована в экспрессионные плазмиды с разными селективными маркерами: для CHO — ген устойчивости к пуromицину, для CHO-GS — ген глутаминсинтетазы (рис. 1).

Расчет ростовых характеристик клеточных культур

Плотность жизнеспособных клеток, жизнеспособность культуры определяли с помощью автоматического счетчика клеток Countess II FL Automated Cell Counter (“Thermo Fisher Scientific”, США). Кумулятивную клеточную плотность (CCD) и удельную продуктивность (Qp) вычисляли по формулам, описанным в работе [1].

Трансфекция клеток линии CHO методом электропорации

Клетки линии CHO были трансфицированы препаратами линейаризованной плазми-

Таблица 1. Плазмиды, использованные для нокаута глутаминсинтетазы
Table 1. Plasmids used for glutamine synthetase knockout

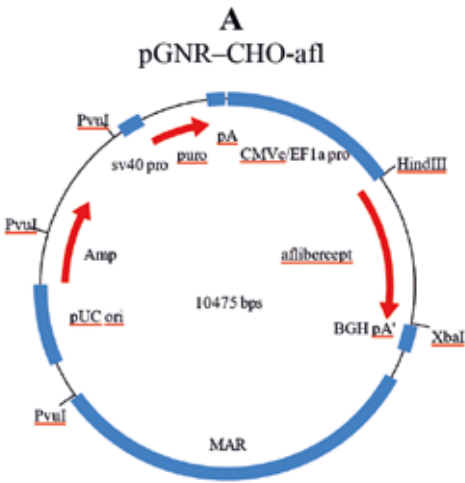
Плаزمида	Описание
pFok+ex5	Плазмида для экспрессии Fok+ нуклеазы цинковых пальцев, специфичной к последовательности 5-го экзона гена глутаминсинтетазы <i>C. griseus</i>
pFok-ex5	Плазмида для экспрессии Fok- нуклеазы цинковых пальцев, специфичной к последовательности 5-го экзона гена глутаминсинтетазы <i>C. griseus</i>
pFok+ex7	Плазмида для экспрессии Fok+ нуклеазы цинковых пальцев, специфичной к последовательности 7-го экзона гена глутаминсинтетазы <i>C. griseus</i>
pFok-ex7	Плазмида для экспрессии Fok- нуклеазы цинковых пальцев, специфичной к последовательности 7-го экзона гена глутаминсинтетазы <i>C. griseus</i>

ды, несущей ген афлиберцепта совместно с геном устойчивости к пуромицину (для трансфекции клеток линии CHO) или с геном глутаминсинтетазы (для трансфекции клеток линии CHO-GS). Перед трансфекцией определяли плотность жизнеспособных клеток и жизнеспособность культуры. Клетки ресуспендировали в буфере для электропорации. В клеточную суспензию вносили плазмидную ДНК и проводили

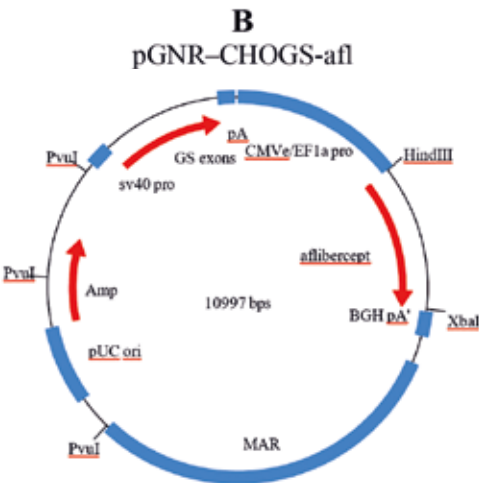
электропорацию клеток в камерах ОС-100 с использованием системы для трансфекции MaxCyte STX (“MaxCyte”, США) по инструкции производителя [1].

Получение минипулов

Трансфицированные клетки высевали в плоскостонные 96-луночные планшеты по 100 мкл/лунку в среде BCD с селективными агентами. Минипулы культивировали в стационарных условиях в течение 14 сут



Плазмида для экспрессии белка афлиберцепт под контролем гибридного CMV/hEF1 промотора, содержащая эукариотический селективный маркер устойчивости к пуромицину (ген пуромицин N-ацетилтрансферазы *S. alboniger*)



Плазмида для экспрессии белка афлиберцепт под контролем гибридного CMV/hEF1 промотора, содержащая эукариотический селективный маркер (ген глутаминсинтетазы *C. griseus*)

Рис. 1. Карты плазмид с геном афлиберцепта для линии CHO и CHO-GS.
Fig. 1. Plasmid maps with aflibercept gene for CHO and CHO-GS lines.

при 37°C, 5% CO₂ и влажности 70%. Затем проводили ряд скринингов по продуктивности минипулов методом ИФА.

Получение клонов-продуцентов

Клеточные пулы, экспрессирующие афлиберцепт, были клонированы в полутвердую среду ClonaCell Flex (“STEMCELL”, Канада) с посевной концентрацией 10 клеток/мл. Планшеты с растущими колониями клонов инкубировали 10 сут при 37°C, в условиях 5% CO₂, 70% влажности в CO₂-инкубаторе (“Sanyo”, Япония). Отбор клонов проводили с помощью роботизированной системы Clone Pix FL (“Molecular Devices”, США).

Иммуноферментный анализ

Для определения концентрации (продуктивности, мг/л) рекомбинантного афлиберцепта в культуральной жидкости (КЖ) проводили иммуноферментный анализ (ИФА) в 96-луночных планшетах Maxi-sorb Microplates (“Nunc”, Дания). Для сорбции использовали поликлональные козы антитела против иммуноглобулина человека (“Sigma”, Япония). В качестве детектирующих антител использовали поликлональные козы антитела против иммуноглобулина человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (“Sigma”, Япония). В качестве стандарта использовали референтный препарат афлиберцепт «EYLEA» (“Bayer”, Германия). Измерения проводили на спектрофотометре Benchmark Plus (“Bio-Rad Laboratories”, США) при OD-450.

Периодическое культивирование клеток с подпиткой

Культивирование клонов — продуцентов афлиберцепта проводили в биореакторах Ambr® 15 Cell Culture Bioreactor System (“Sartorius”, Германия). Посевная концентрация клеток составляла $0,3 \times 10^6$ клеток/мл, в качестве добавки питательной среды использовали BalanCD CHO Feed 4 (“FUJIFILM IRVINE SCIENTIFIC INC”, США). Культивирование клонов проводили в условиях 5% CO₂ и 37°C при 800 об/мин на шейкере-инкубаторе Climo-Shaker ISF1-XC (“Kuhner”, Германия).

Определение уровня лактата и глюкозы

Для определения уровня лактата и глюкозы в культуральной жидкости использовали прибор Biosen C-line (“EKF — diagnostic GmbH”, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Хроматографическая очистка афлиберцепта

Хроматографическую очистку афлиберцепта проводили с использованием системы АКТА Purifier (“GE”, Швеция). В качестве аффинного сорбента использовали MabSelect SuRe. Культуральную жидкость, содержащую целевой белок, наносили на колонку, предварительно уравновешенную стартовым буфером (“Cytiva”, Швеция). По окончании нанесения сорбент последовательно промывали по 5 CV стартового и кондиционирующего (50 mM ацетата натрия, pH=5,5) буферных р-ров. Белок элюировали р-ром, содержащим 50 mM ацетата натрия, pH=3,8. По окончании первой стадии pH элюата доводили до 7,5 2 М р-ром Трис-буфера. Концентрацию белка определяли по оптическому поглощению при 280 нм, используя в качестве коэффициента экстинкции значение 1,16.

Статистический обсчет результатов

Выполнен в программе Graph Pad Prism 6. Использовали однофакторный дисперсионный анализ one-way ANOVA test или t-критерий Стьюдента (unpaired t-test). $P_{\text{value}} < 0,0001 = ****$, $P_{\text{value}} < 0,001 = ***$, $P_{\text{value}} < 0,01 = **$, $P_{\text{value}} < 0,05 = *$, ns — нет статистической разницы, данные представлены в виде бокс-плотов.

Результаты исследований

Получение минипулов — продуцентов рекомбинантного афлиберцепта на основе клеточных платформ CHO и CHO-GS

Трансфекцию клеточных линий CHO и CHO-GS проводили методом электропорации на приборе MaxCyte STX. Для трансфекции использовали плазмиды pGNR—

Таблица 2. Жизнеспособность клеточных пулов после трансфекции
Table 2. Cell pool viability after transfection

Клеточная линия	Плазмиды	Время после трансфекции, ч			
		24	48	24	48
		VCD, $\times 10^6$ клеток/мл	Жизне-способность, %	VCD, $\times 10^6$ клеток/мл	Жизне-способность, %
CHO	pGNR-CHO-afl	1,41	89	2,13	91
CHO-GS	pGNR-CHOGS-afl	1,16	94	1,96	92
CHO	Контроль	1,43	98	2,34	97
CHO-GS	Контроль	0,65	93	1,49	93

CHO-afl и pGNR-CHOGS-afl с целевым геном, кодирующим афлиберцепт (рис. 1).

Через 24 и 48 ч после электропорации определяли жизнеспособность и плотность жизнеспособных клеток трансфицированных пулов (табл. 2), после чего рассевали их на минипулы в селективные условия на двадцать 96-луночных планшетов для каждой линии. В случае клеточной платформы CHO в качестве селективного агента использовали антибиотик пурамицин; в случае клеточной платформы CHO-GS в качестве селективных условий использовали ростовую среду без добавления L-глутамина.

Далее проводили ряд скринингов с помощью ИФА, позволяющих выявить наиболее продуктивные линии клеток из двух групп (рис. 2).

В результате скрининга проб КЖ минипулов из 96-луночных планшетов, максимальная продуктивность линий на основе CHO составила около 40 мг/л, для продуцентов на основе CHO-GS — около 90 мг/л (рис. 2A) на 14-е сут стационарного культивирования. Лидерные 200 минипулов из каждой группы перенесли в больший объем селективной среды в 12-луночные планшеты, после чего культивировали при стационарных условиях и проводили ИФА. Максимальная продуктивность линий на основе CHO составила около 18 мг/л, для продуцентов на основе CHO-GS — около 32 мг/л (рис. 2B). Затем по 88 минипулов из каждой группы перенесли в больший объем селективной среды в 6-луночные планшеты и после стационарного культивирования провели анализ

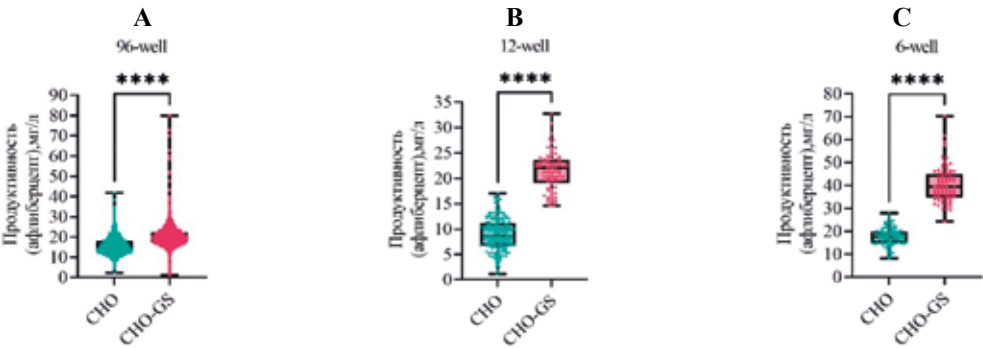


Рис. 2. Продуктивность минипулов на основе клеточных платформ CHO и CHO-GS во время проведения скрининга методом ИФА, мг/л: А — 96-луночных планшетов; В — 12-луночных планшетов; С — 6-луночных планшетов; CHO — клоны-продуценты афлиберцепта на основе линии CHO; CHO-GS — клоны-продуценты афлиберцепта на основе линии CHO-GS.

Fig. 2. Minipool productivity based on CHO and CHO-GS cell platforms during ELISA screening, mg/L: А — 96-well plates; В — 12-well plates; С — 6-well plates; CHO — aflibercept-producing clones based on CHO line; CHO-GS — aflibercept-producing clones based on CHO-GS line.

продуктивности минипулов; максимальная продуктивность линий в ходе скрининга в 6-луночных планшетах на основе CHO составила 30 мг/л, для продуцентов на основе CHO-GS — 70 мг/л (рис. 2С). По результатам последнего скрининга отобрали лидирующие минипулы из каждой группы для клонирования.

Получение клонов — продуцентов рекомбинантного афлиберцепта на основе клеточных платформ CHO и CHO-GS

Клоны-продуценты получали с помощью автоматизированной системы отбора колоний Clone Pix FL. Для каждой выборки были получены около 1000 клонов. Для определения наиболее продуктивных моноклональных клеточных линий проводили серию скринингов проб КЖ клонов методом ИФА (данные не приведены).

Лидерные клоны, по 10 из каждой группы, полученные после проведения серии скринингов, адаптировали к шейкерному культивированию, а затем культивировали 15 сут с подпиткой с использованием системы мини-биореакторов ambr™ 24 TAP Biosystems. Данная роботизированная система, прин-

цип работы которой описан в работе [14], предназначена для имитации условий промышленного биореактора в минимальных объемах 10–15 мл и позволяет спрогнозировать поведение культуры в условиях промышленного реакторного культивирования. В роботизированной системе во время процесса культивирования можно наблюдать уровень поступающих газов в мини-биореактор (CO_2 и O_2), pH и уровень растворенного кислорода в среде.

На рис. 3 отражены основные характеристики роста клонов — продуцентов афлиберцепта на основе CHO и CHO-GS в динамике. На рис. 4 представлены стандартные модели проведения культивирования в условиях мини-биореакторов ambr™ 24 TAP Biosystems.

Во время периодического культивирования в роботизированной системе (рис. 4) к 15-м сут жизнеспособность клонов составляла в среднем $65 \pm 15\%$ на основе CHO и $73 \pm 10\%$ на основе CHO-GS (рис. 3А); концентрация жизнеспособных клеток составляла $(16,1 \pm 5,8) \times 10^6$ клеток/мл на основе CHO и $(11,1 \pm 4,4) \times 10^6$ клеток/мл на основе

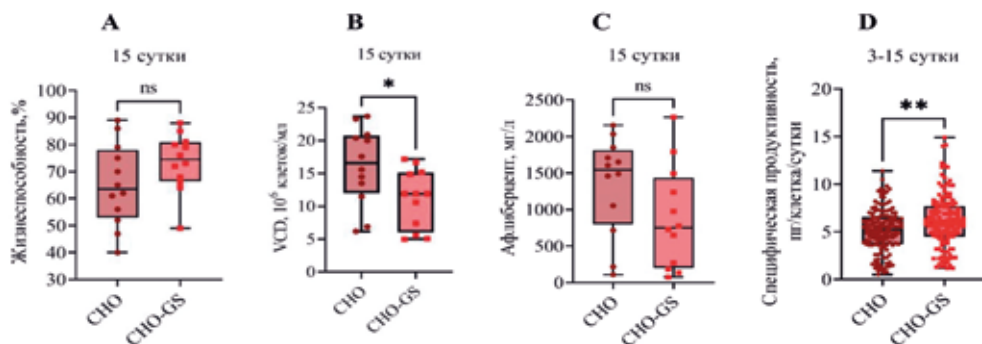


Рис. 3. Сравнение двух клеточных линий клонов-продуцентов афлиберцепта во время непрерывного культивирования: А — жизнеспособность клеток, %; В — плотность жизнеспособных клеток, VCD, $\times 10^6$ клеток/мл; С — волюметрическая продуктивность на 15 сут культивирования, мг/л; D — удельная продуктивность клеток с 3 по 15 сут культивирования, (пг/(клетка $\times$ сут)). CHO — клоны-продуценты афлиберцепта на основе линии CHO; CHO-GS — клоны-продуценты афлиберцепта на основе линии CHO-GS.

Fig. 3. Comparison of two cell lines of aflibercept-producing clones during continuous cultivation: A — cell viability, %; B — viable cell density, VCD, $\times 10^6$ cells/mL; C — volumetric productivity at 15 days of culturing, mg/L; D — specific cell productivity from 3 to 15 days of culturing, (pg/(cell $\times$ day)). CHO — aflibercept-producing clones based on CHO line; CHO-GS — aflibercept-producing clones based on CHO-GS line.

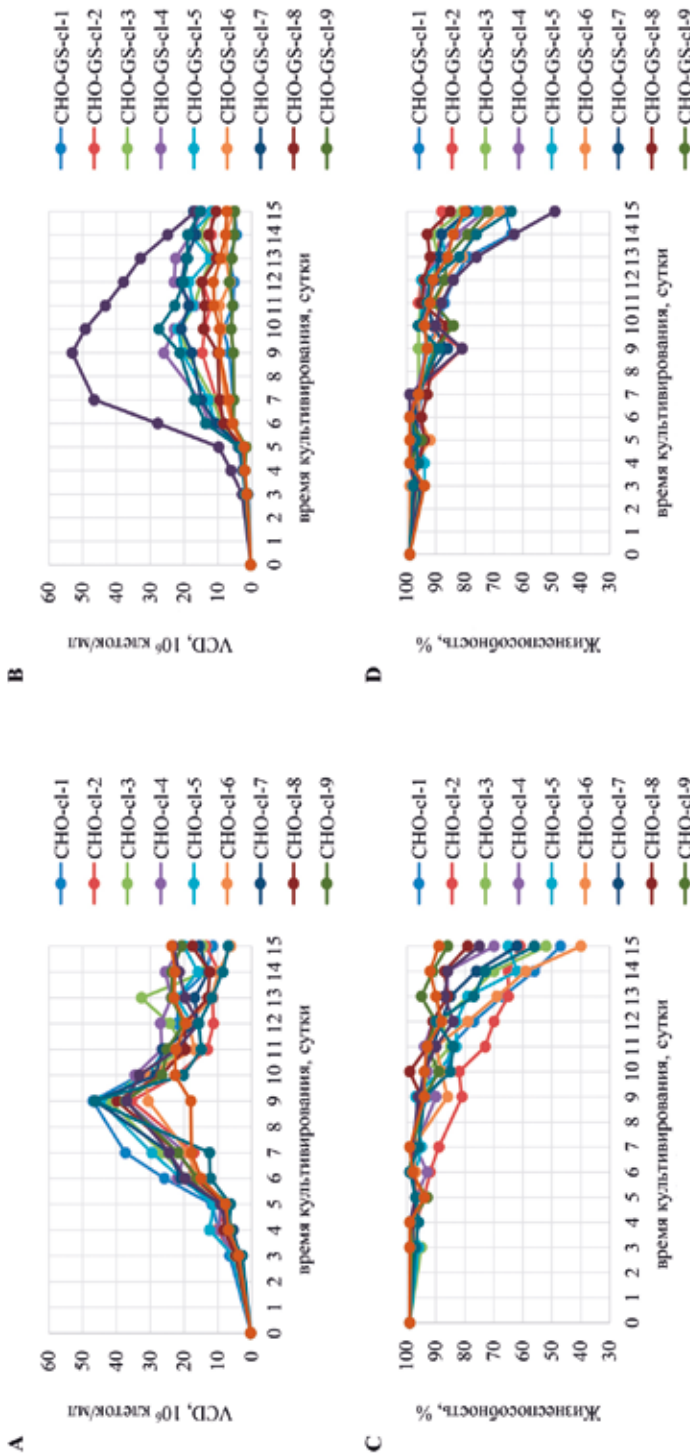


Рис. 4. Непрерывное культивирование с подпиткой клонов — продуцентов афлиберцепта на двух клеточных линиях CHO и CHO-GS в течение 15 сут в системе мини-биореакторов ambTM 24 Tap Biosystems: A, B — плотность жизнеспособных клеток, $\times 10^6$ клеток/мл; C, D — жизнеспособность клеток, %. CHO-cl — клоны — продуценты афлиберцепта, полученные на основе CHO; CHO-GS-cl — клоны — продуценты афлиберцепта, полученные на основе CHO-GS, ауко-трофной по глутамину.

Fig. 4. Continuous cultivation with feeding of afiberscept-producing clones on two cell lines CHO and CHO-GS for 15 days in ambTM 24 Tap Biosystems mini-bioreactor system: A, B — density of viable cells, $\times 10^6$ cells/mL; C, D — cell viability, %. CHO-cl — afiberscept-producing clones derived from CHO; CHO-GS-cl — afiberscept-producing clones derived from glutamine auxotrophic SNO-GS.

CHO-GS (рис. 3B); концентрация целевого рекомбинантного белка клонов составляла $1,33 \pm 0,67$ г/л на основе CHO и $0,88 \pm 0,70$ г/л на основе CHO-GS (рис. 3C); удельная продуктивность клеток за все время процесса (с 3 по 15 сут) составляла $5,20 \pm 2,27$ пг/клетка/сут на основе CHO и $6,10 \pm 2,75$ пг/клетка/сут на основе CHO-GS (рис. 3D).

Несмотря на более высокую концентрацию целевого рекомбинантного белка на основе CHO, для промышленного использования был выбран клон, обладающий наибольшей удельной продуктивностью на основе CHO-GS.

На рис. 4 представлены результаты измерения профиля гликозилирования после выделения полученного белка и его очистки. Важно отметить, что полученный профиль гликозилирования сравним с референтным препаратом «Эйлея» (рис. 5).

Обсуждение результатов

При разработке продуцентов рекомбинантного афлиберцепта с использованием двух родительских линий лидирующую по-

зицию по продуктивности занимала клеточная линия CHO-GS (рис. 2).

При культивировании с подпиткой в минибиореакторах наблюдали сравнимую для двух групп жизнеспособность культуры (рис. 3A) и волнометрическую продуктивность целевого белка (рис. 3C), однако вместе с тем наблюдали статистически подтвержденную разницу плотности жизнеспособных клеток двух групп (рис. 3B). Также выявили, что удельная продуктивность клеток на основе CHO-GS выше: $6,10 \pm 2,75$ вместо $5,20 \pm 2,27$ пг/клетка/сут на основе CHO (рис. 3D), данный параметр количественно определяет скорость экспрессии белка в единицу времени и является, на наш взгляд, ключевым. Удельная продуктивность клеточных линий зависит от двух показателей: содержания (титра) белка (г/л) и концентрации жизнеспособных клеток. Соответственно, можно сделать вывод о том, что полученная клеточная линия CHO-GS более привлекательна для получения промышленных продуцентов при прочих равных условиях, экспрессируя сравнимое количество белка, а также имеет более

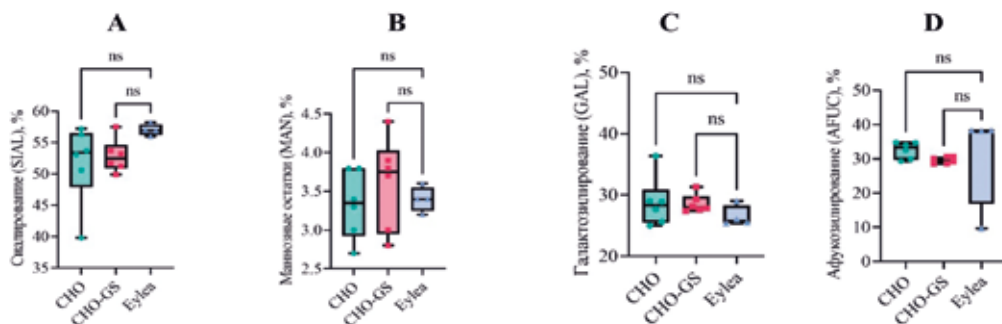


Рис. 5. Содержание основных гликанов (%), характерных для полученного рекомбинантного афлиберцепта, в сравнении с референтным препаратом Эйлея: А — сиализированные гликаны; В — маннозные остатки; С — галактозиллированные гликаны; D — афукозиллированные гликаны. CHO — клоны — продуценты афлиберцепта на основе линии CHO; CHO-GS — клоны — продуценты афлиберцепта на основе линии CHO-GS.

Fig. 5. Content of basic glycans (%) characteristic of the obtained recombinant aflibercept in comparison with the reference drug Eylea: A — sialylated glycans; B — mannose residues; C — galactosylated glycans; D — afucosylated glycans. CHO — aflibercept-producing clones based on CHO line; CHO-GS — aflibercept-producing clones based on CHO-GS line.

низкую плотность жизнеспособных клеток, что, в свою очередь, благоприятно влияет на последующие стадии очистки препарата (очистка белка, очистка препарата от белков клеток-хозяина, в нашем случае — белков CHO, и пр.). При этом увеличение скорости образования продукта (удельная продуктивность) у продуцентов группы CHO-GS не повлияло на снижение качества посттрансляционных модификаций рекомбинантного белка, в т. ч. профиля гликозилирования (рис. 5). По результатам, представленным на рис. 5, видно, что при сравнении ключевых показателей гликозилирования афлиберцепта, полученного на основе CHO и CHO-GS, и референтного препарата статистически значимых отличий не выявлено.

Закключение и выводы

1. Получены моноклональные клеточные линии — продуценты рекомбинантного белка афлиберцепт на основе двух клеточных линий CHO и CHO-GS.
2. Сравнение двух клеточных линий CHO и CHO-GS от начала разработки до получения финальных клонов-продуцентов показало преимущество использования клеточной линии CHO-GS по показателю удельной продуктивности, качеству продукта, что, по видимому, обусловлено особенностями ее селекции по метаболическому маркеру.
3. По результатам проведенного исследования считаем, что для получения рекомбинантных белков терапевтического назначения целесообразнее использовать линию CHO-GS.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Тимонова С.С., Павелко В.И., Кирик И.А., Бадэ В.Н., Малыгина Т.О., Хамитов Р.А., Пискунов А.А. Принцип оперативного выбора лидерных клонов-продуцентов моноклональных антител при создании стабильных клеточных линий на основе CHO. *Биотехнология*. 2019;35(4):65–72. [Timonova S.S., Pavelko V.I., Kirik I.A., Bade V.N., Malygina T.O., Khamitov R.A., Piskunov A.A. Principle of leading producing clones of monoclonal antibodies in the development of stable CHO-based cell lines]. *Biotechnology*. 2019;35(4):65–72 (In Russian)]. DOI: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-65-72.
2. Adams B.S., Sorhaitz W., Stringham J. Afibercept. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC, 2025.
3. Cheng G., Ning J., Ahmed S., Huang J., Ullah R., An B., Hao H., Dai M., Huang L., Wang X., Yuan Z. Selection and dissemination of antimicrobial resistance in Agri-food production. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8:158.
4. Dong W.R., Xiang L.X., Shao J.Z. Novel antibiotic-free plasmid selection system based on complementation of host auxotrophy in the NAD de novo synthesis pathway. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(7):2295–2303.
5. Fann C.H., Guirgis F., Chen G., Lao M.S., Piret J.M. Limitations to the amplification and stability of human tissue-type plasminogen activator expression by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*. 2000;69(2):204–212.
6. Foley J.E., Maeder M.L., Pearlberg J., Joung J.K., Peterson R.T., Yeh J.R. Targeted mutagenesis in zebrafish using customized zinc-finger nucleases. *Nat. Protoc*. 2009;4(12):1855–1867.
7. Klümper U., Recker M., Zhang L., Yin X., Zhang T., Buckling A., Gaze W.H. Selection for antimicrobial resistance is reduced when embedded in a natural microbial community. *ISME J*. 2019;13(12):2927–2937.
8. Lanzetta P., Korobelnik J.F., Heier J.S., Leal S., Holz F.G., Clark W.L., Eichenbaum D., Iida T., Xiaodong S., Berliner A.J., Schulze A., Schmelter T., Schmidt-Ott U., Zhang X., Vitti R., Chu K.W., Reed K., Rao R., Bhore R., Cheng Y., Sun W., Hirshberg B., Yancopoulos G.D., Wong T.Y., PULSAR Investigators. Intravitreal aflibercept 8 mg in neovascular age-related macular degeneration (PULSAR): 48-week results from a randomised, double-masked, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet*. 2024;403(10432):1141–1152.
9. Liberski S., Wichrowska M., Kocięcki J. Afibercept versus Faricimab in the Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration and Diabetic Macular Edema: A Review. *Int. J. Mol. Sci*. 2022;23(16):9424.
10. Lin P.C., Chan K.F., Kiess I.A., Tan J., Shahreel W., Wong S.Y., Song Z. Attenuated glutamine synthetase as a selection marker in CHO cells to efficiently isolate highly productive stable cells for the production of antibodies and other biologics. *MABs*. 2019;11(5):965–976.
11. Pallavicini M.G., DeTeresa P.S., Rosette C., Gray J.W., Wurm F.M. Effects of methotrexate on transfected DNA stability in mammalian cells. *Mol. Cell Biol*. 1990;10(1):401–404.
12. Pana M., ed. Antibiotic resistant bacteria: A continuous challenge in the new millennium. Rijeka, Croatia: InTech, 2012:531–548.

13. Peubez I., Chaudet N., Mignon C., Hild G., Husson S., Courtois V., De Luca K., Speck D., Sodoyer R. Antibiotic-free selection in *E. coli*: new considerations for optimal design and improved production. *Microb Cell Fact.* 2010;9:65.
14. Ryu A.H., Eckalbar W.L., Kreimer A., Yosef N., Ahituv N. Use antibiotics in cell culture with caution: genome-wide identification of antibiotic-induced changes in gene expression and regulation. *Sci Rep.* 2017;7(1):7533.
15. Santiago Y., Chan E., Liu P.Q., Orlando S., Zhang L., Urnov F.D., Holmes M.C., Guschin D., Waite A., Miller J.C., Rebar E.J., Gregory P.D., Klug A., Collingwood T.N. Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(15):5809–5814.
16. Yıldırım M.E., Karadurmuş N., Ökten İ.N., Türk H.M., Uraççı Z., Arslan Ç., Çelik S., Dane F., Şendur M.A.N., Bilir C., Karabulut B., Cicin İ., Çubukçu E., Karaca M., Özcelik M., Artaç M., Tanrikulu E., Alacacioglu A., Açıkgoz Ö., Öven B., Geredeli Ç., Çil T., Harputluoğlu H., Kefeli U., Bozkurt O., Tural D., Sakin A., Yalçın Ş., Gumus M. Real-world treatment outcomes from nationwide Onco-colon Turkey registry in RAS wild-type patients treated with biologics second-line mCRC. *J. Oncol. Pharm. Pract.* 2024;10781552241241004.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Тимонова Софья Сергеевна*, АО «ГЕНЕ-РИУМ»;
e-mail: timonova1993@yandex.ru

Sofya S. Timonova*, GENERIUM;
e-mail: timonova1993@yandex.ru

Кирик Инесса Анатольевна, АО «ГЕНЕ-РИУМ»;
e-mail: Kirik@ibcgenerium.ru

Inessa A. Kirik, GENERIUM;
e-mail: Kirik@ibcgenerium.ru

Зарипова Долия Тагировна, АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: zaripova@ibcgenerium.ru

Dolia T. Zaripova, GENERIUM;
e-mail: zaripova@ibcgenerium.ru

Фарсиева Регина Ильгизовна, АО «ГЕНЕ-РИУМ»;
e-mail: farsieva@ibcgenerium.ru

Regina I. Farsieva, GENERIUM;
e-mail: farsieva@ibcgenerium.ru

Каргополов Иван Андреевич, АО «ГЕНЕ-РИУМ»;
e-mail: kargopolov96@mail.ru

Ivan A. Kargopolov, GENERIUM;
e-mail: kargopolov96@mail.ru

Анисимов Роман Львович, АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: Anisimov@ibcgenerium.ru

Roman L. Anisimov, GENERIUM;
e-mail: Anisimov@ibcgenerium.ru

Пискунов Александр Александрович, АО «ГЕНЕ-РИУМ»;
e-mail: Piskunov@ibcgenerium.ru

Alexander A. Piskunov, GENERIUM;
e-mail: Piskunov@ibcgenerium.ru

Хамитов Равиль Авгатович, АО «ГЕНЕ-РИУМ»;
e-mail: Khamitov@ibcgenerium.ru

Ravil A. Khamitov, GENERIUM;
e-mail: Khamitov@ibcgenerium.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author