

1 – Научно-образовательный интернет-ресурс «ЭкспертБИОТЕХ», <http://expert-biotech.com>

2 – Экспериментальное биотехнологическое производство, Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098, Россия, г. Москва, ул. Гамалеи, 18

1 – Research-Educational Internet Portal «ExpertBIOTECH», <http://expert-biotech.com>

2 – Experimental Biotech Facilities, N.F. Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health, 18, Gamaleya str., Moscow, 123098, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: dmitriy.gusarov@expert-biotech.com

СОЗДАНИЕ ПРОМЫШЛЕННОЙ ТЕХНОЛОГИИ БИОСИНТЕЗА Фолликулостимулирующего Гормона В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК CHO

Д.А. Гусаров^{1*}, А.И. Государев², В.Д. Гусарова², Д.В. Бырихина², Ф.М. Ижаева²

Резюме. В статье обсуждается разработка технологии получения фолликулостимулирующего гормона, используемого при лечении бесплодия, в культуре яйцеклеток китайского хомячка. В рамках создания технологической платформы получения гормона был оптимизирован биопроцесс в биореакторе волнового типа. Изучен ряд параметров, влияющих на биопроцесс: оптимальная клеточная плотность, концентрация метаболитов, сдвиг температуры и его продолжительность.

Ключевые слова: биопроцесс, клеточные линии, апстрим-процесс, фолликулостимулирующий гормон.

THE DEVELOPMENT OF A PRODUCTION SCALE TECHNOLOGY OF RECOMBINANT FOLLICLE STIMULATING HORMONE BIOPROCESS IN CHO CELL LINE

D.A. Gusarov^{1*}, A.I. Gosudarev², V.D. Gusarova², D.V. Byrikhina², F.M. Izhaeva²

Abstract. The article discusses the development of a production technique for recombinant follicle-stimulating hormone used in the treatment of infertility, in the culture of Chinese hamster ovary cells. As part of the creation of the technological platform receiving hormone the bioprocess in wave-induced motion bioreactor has been optimized. A number of parameters that influence on the bioprocess was studied, as follows: optimal cell density, concentration of metabolites, temperature shift and its duration.

Keywords: bioprocess, cell line, upstream process, follicle stimulating hormone.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема бесплодия в России является одной из актуальных проблем здравоохранения. По оценкам специалистов, каждая шестая пара в нашей стране является бесплодной [1]. Поиск решения данной проблемы идет как в направлении клинических вопросов (создание новых лекарственных препаратов, новых схем лечения), так и в области эмбриологии (новые среды и методы культивирования эмбрионов, новые приборы и оборудование).

Одними из перспективных препаратов для терапии бесплодия являются препараты на основе фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), которые используются для лечения бесплодия у женщин начиная с середины XX века.

ФСГ – гликопротеиновый гормон, относящийся к группе питуитарных гормонов (гонадотропинов), продуцируемых передней долей гипофиза [2, 3]. Все гонадотропины являются димерными бел-

ками, состоящими из двух неодинаковых гликопротеиновых субъединиц, связанных нековалентно. α -субъединица состоит из 92 а.о., в том числе 12 остатков цистеина, образующих 5 дисульфидных связей в положении 7-31, 10-60, 28-82, 32-84 и 59-87 (рисунок 1) [4]. Два N-связанных олигосахаридов α -субъединицы располагаются при остатках аспарагина в положении 52 и 78. Гормонспецифичная β -субъединица ФСГ состоит из 111 аминокислот, имеет шесть дисульфидных связей в положении 3-51, 17-66, 20-104, 28-82, 32-84, 87-94 соответственно [5]. Изоэлектрическая точка колеблется (в силу вариабельности гликозидного фрагмента) в диапазоне от 5,5 до 3,8 [6].

Применение методов рентгеноструктурного анализа позволило определить пространственную структуру субъединиц ФСГ. Пространственные конформации как α -, так и β -субъединиц имеют схожую топологию, для которой характерным фрагментом является «цистиновый узел». Он образован тремя дисульфидными связями:



Рисунок 1. Аминокислотная последовательность рекомбинантного ФСГ человека. Красным цветом отмечены остатки цистеинов: одиннадцать дисульфидных связей

связь между остатками Cysα10 (β3) и α60 (β51) проходит через кольцо, образованное двумя дисульфидными мостиками между остатками Cys 28-82 и Cys 32-84 (остатки цистина как α-, так и β-субъединицы одинаковы). Рядом с «цистиновым узлом» располагаются три β-шпильки, две из которых заканчиваются β-витками на одном конце молекулы (петли αL1 и αL3), в то время как третья шпилька образует более открытую петлю (βL2) на противоположном конце (рисунок 2) [7, 8].



Рисунок 2. Пространственное строение субъединиц ФСГ

Гликозидный фрагмент ФСГ составлен остатками шести сахаров: фруктозы, галактозы, галактозамина, глюкозамина, маннозы и сиаловой кислоты. Два сайта связывания гликозидных остатков располо-

жены в β-субъединице при 7 и 24 остатках аспарагина, в α-субъединице при 52 и 78 остатках аспарагина. Строение углеводных участков гетеродимера является варибельным, может существовать в форме разветвленных цепей, которые завершаются остатками сиаловой кислоты (рисунок 3).

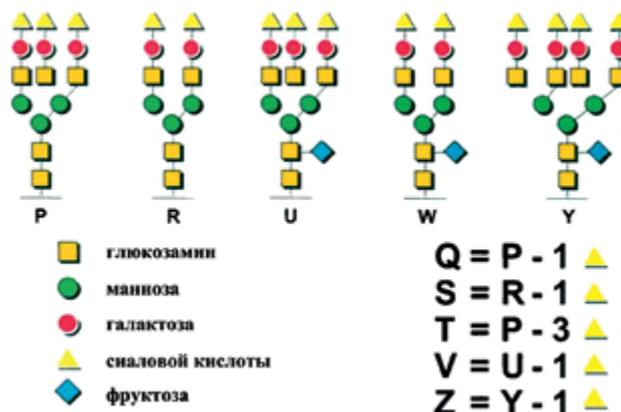


Рисунок 3. Структура боковых гликозидных цепей, связанных с α- и β-субъединицами в ФСГ человека

Причем различие в содержании остатков сиаловой кислоты в молекуле ФСГ играет основную роль в определении времени жизни гетеродимера: более кислые изоформы ФСГ (с большим содержанием остатков сиаловой кислоты в углеводном фрагменте) отличаются большим временем жизни и более высокой биологической активностью по сравнению с менее кислыми изоформами. Это связано с тем, что менее кислые изоформы гетеродимера обладают большей тропностью к асиалогликопротеиновым рецепторам плазматической мембраны печени и почек и, связываясь с ними, исключаются из циркуляции в организме человека. Различие в углеводной структуре ФСГ, и прежде всего в гормонспецифичной β-субъединице, определяет биологическую активность ФСГ и специфическое связывание с рецептором.

Цель исследования – разработать и оптимизировать биопроцесс получения ФСГ в клетках CHO.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовалась модифицированная культура клеток CHO-K1 (Invitrogen, для исследовательских целей), генетически запрограммированная на биосинтез фолликулостимулирующего гормона в ходе двухфазного биопроцесса (фаза биосинтеза индуцировалась термическим шоком на фазе роста в оптимальной клеточной плотности [9]).

Посевную культуру выращивали на колбах Эрленмайера в инкубаторе BINDER CB 53 (Binder, Германия) в течение нескольких дней до получения посевного материала в количестве четырех колб по 120 мл в каждой со средней плотностью 2 млн кл./мл.



BINDER CB 53

Затем посевной материал переводили в биореактор волнового типа WAVE Bioreactor System 20/50 (GE Lifescience, Швеция) и выращивали при стандартных условиях на питательной среде Lonza ProCHO (Lonza, Швейцария) до клеточной плотности 4 млн кл./мл.



Рисунок 4. Биореактор волнового типа производства GE Lifescience

Вторую фазу процесса (биосинтез) индуцировали снижением температуры в биореакторе до 31 °С. Организовывали стерильную внешнюю перфузию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биопроцесс вели в три этапа: выращивали посевной материал в колбах; засеивали одноразовый биореактор материалом из колб и продолжали выращивание культуры в биореакторе; снижали температуру в биореакторе для инициирования производственной фазы. На первом этапе по результатам ФМЕА высоко-

приоритетным параметром является конечная плотность живых клеток (VCD), используемая для посева биореактора. Этот параметр влияет сразу на два показателя – время достижения оптимальной плотности в ростовой фазе и содержание ФСГ в среде на старте и в конце производственной фазы. Как видно из представленных данных, при низкой VCD рост имеет значительную log-фазу, что отражается на времени достижения оптимальной плотности (рисунок 5). Оптимальная конечная VCD в колбах лежит в диапазоне $2 \pm 0,5$ млн кл./мл – при такой плотности удавалось получить максимальный титр белка на производственной фазе в биореакторе. Это, по-видимому, связано с тем, что секреторный ФСГ производится в некотором количестве и в ростовой фазе, накапливаясь в среде, и поэтому производственная фаза в оптимальной плотности запускается уже с некоторым количеством белка, пропорциональным количеству живых клеток. Также эта версия подтверждается тем, что как на старте, так и в конце производственной фазы зависимость титра ФСГ от конечной VCD в колбах (а следовательно, стартовой VCD в биореакторе) изменяется практически одинаково. В дополнение благодаря этому опыту удалось определить и оптимальную VCD в конце производственной фазы, которая с учетом времени удвоения культуры 22–24 ч была равна $3,5 \pm 0,5$ млн кл./мл.

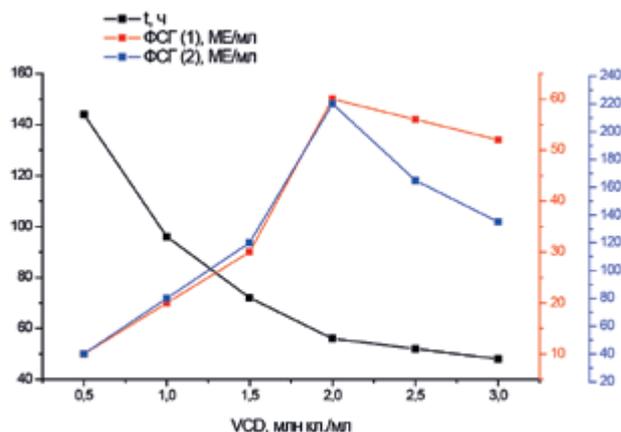


Рисунок 5. Зависимость времени достижения оптимальной клеточной плотности в биореакторе и титра ФСГ на старте (1) и в конце (2) производственной фазы от плотности живых клеток в колбах (посевной материал)

Высокоприоритетные параметры, такие как DO и скорость перемешивания, были запрограммированы в каскаде, так как являются взаимозависимыми; каскад программировался на достижение оптимальной плотности культуры при минимальном (30%) содержании воздуха в биореакторе. Кроме того, мы оптимизировали и другие высокоприоритетные па-

раметры, такие как pH среды, накопление метаболитов (лактатов) и продолжительность температурного сдвига. Для этого был разработан экспрессный офлайн-метод контроля содержания лактатов в среде с помощью СВЭЖХ (UPLC). Определение занимает всего 8 мин. Валидация метода была проведена в соответствии с требованиями ICH Q2(R1).

Как видно из представленного графика, pH в диапазоне от 6,5 до 7,5 (изменялся с помощью углекислого газа и гидроксида натрия) не имеет достоверного влияния на клеточную плотность, однако значительно влияет на накопление белка в среде (рисунок 6).

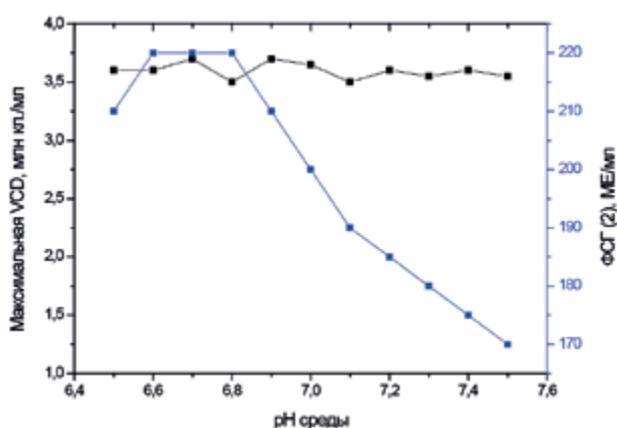


Рисунок 6. Влияние pH среды на максимальную VCD и конечный титр ФСГ в производственной фазе

Возможно, это объясняется тем, что оптимальный гликозилированный профиль ФСГ, состоящий из кислых остатков (в основном из сиаловой кислоты), синтезируется в кислых условиях среды, когда накапливаемые лактаты могут потребляться клетками. В то же время накапливаемые в слабословных условиях лактаты клетками не потребляются, что видно из данных, представленных на рисунке 7.

Сдвиг температуры (снижение температуры на несколько градусов относительно «ростовой» температуры, 37 °C) стрессует клетки, заставляя их производить больше белка. Сдвиг температуры и его продолжительность очень сильно влияли на титр ФСГ, что видно из представленного графика (рисунок 8). Оптимальным режимом производственной фазы оказался сдвиг на 6 градусов в течение 24–32 ч. Более длительный сдвиг апоптировал клетки, что приводило к снижению титра.

Для подтверждения эквивалентности ФСГ, полученного в нашей лаборатории, были выбраны следующие методы:

1. SDS-PAGE;

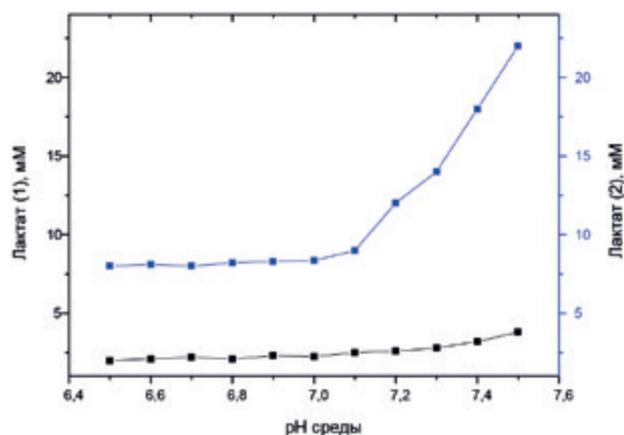


Рисунок 7. Накопление лактатов на 48-й час биопроцесса в ростовой (1) и производственной (2) фазах в зависимости от значения pH среды

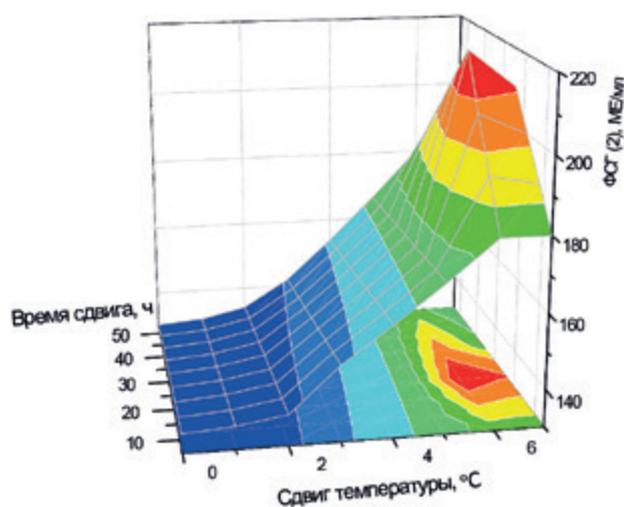


Рисунок 8. Влияние сдвига температуры и его продолжительности на титр ФСГ в конце производственной фазы

2. изоэлектрофокусирование.

В обоих случаях сравнение проводили с коммерческим препаратом «Гонал-Ф» («Сероно С.А.», Франция).

1. SDS-PAGE.

Сравнивали ФСГ нашего производства и «Гонал-Ф» с помощью SDS-PAGE на пятикратной увеличенной нагрузке на дорожку (окрашивание серебром).

Как видно из электрофореграммы (рисунок 9), молекулярная масса (точнее, электрофоретическая подвижность в условиях SDS-PAGE) обоих препаратов идентична.

2. Изоэлектрофокусирование.

Определение изоэлектрической точки крайне важно для гликозилированных белков. Мы сравни-

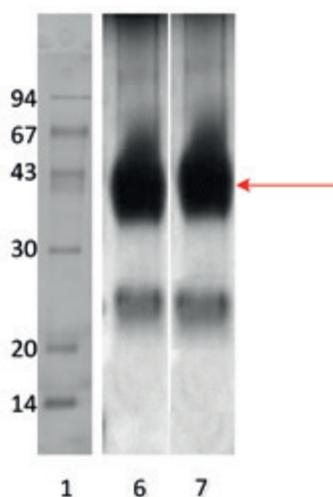


Рисунок 9. SDS-PAGE ФСГ нашего производства (линия 6) и в составе коммерческого препарата «Гонал-Ф» (линия 7). Линия 1 – стандарты молекулярных масс (LMW), слева указаны значения масс в кДа

вали рI нашего образца с рI коммерческого препарата «Гонал-Ф». Как и ожидалось, оба препарата давали мультиплетные полосы в диапазоне рН от 3,5 до 5,5, что говорит об одинаковом профиле гликозилированности обоих белков (рисунок 10).

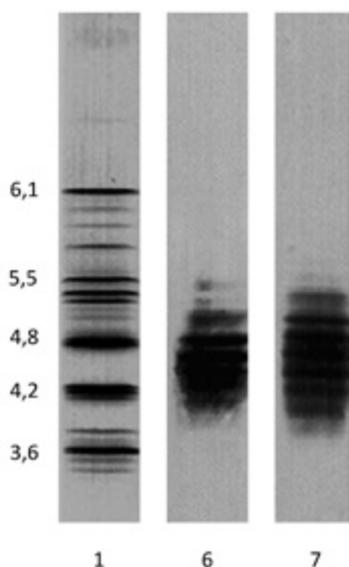


Рисунок 10. Изоэлектрофокусирование ФСГ нашего производства (линия 6) и в составе коммерческого препарата «Гонал-Ф» (линия 7). Линия 1 – стандарты изоэлектрических точек, слева указаны значения рI

Таким образом, можно говорить о практически полной эквивалентности ФСГ, полученного по разработанной нами технологии, и ФСГ в составе коммерческого препарата «Гонал-Ф».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Был разработан биопроцесс получения ФСГ в биореакторе волнового типа. Синтезированный гормон после выделения из культуральной жидкости подвергали многостадийной очистке с целью получения активной фармацевтической субстанции (АФС). Так как ФСГ, технология получения которого нами разработана, является биоаналогом, то его эквивалентность может быть подтверждена путем сравнения с коммерческим препаратом «Гонал-Ф».

ЛИТЕРАТУРА

1. Планирование семьи в России. URL: http://demoscope.ru/weekly/2010/0409/tema05.php#_FNR_17 (дата обращения 20.04.2016).
2. Е.К. Курбанова, Т.Ю. Чулкова, Д.В. Бырихина, А.О. Дано, В.А. Николаева, Д.А. Гусаров. Фарма-2020. Технологические аспекты производства некоторых ЖНВЛП и стратегических лекарственных средств // Биофармацевтический журнал. 2012. Т. 4(3). С. 21-45.
3. И.А. Скрылева, А.В. Исеркапов, Е.В. Воронина, Д.А. Гусаров, В.И. Швец. Разработка концепции стадии up-stream процесса получения фолликулостимулирующего гормона // Биофармацевтический журнал. 2013. Т. 5(2). С. 22–26.
4. Glycoprotein hormones alpha chain. URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/C0KRQ8>. (дата обращения 20.04.2016).
5. Follitropin subunit beta. URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/P01225>. (дата обращения 20.04.2016).
6. A. Ulloa-Aguirre, P. Damián-Matsumura, M. Jiménez, E. Zambrano, V. Díaz-Sánchez. Biological characterization of the isoforms of urinary human follicle-stimulating hormone contained in a purified commercial preparation // Hum Reprod. 1992. V. 7(10). P. 1371–1378.
7. K. M. Fox, J. A. Dias, P. Van Roey. Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone // Molecular Endocrinology. 2001. V. 15(3). P. 378–389.
8. Human Follicle Stimulating Hormone. URL: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1FL7>. (дата обращения 20.04.2016).
9. Д.В. Бырихина, Д.А. Гусаров, Ю.Н. Новиков. QbD в оценке биопроцесса. Применение методов анализа рисков (FMEA) в работе с одноразовыми биореакторами // Биофармацевтический журнал. 2013. Т. 5(6). С. 10–19.