

**Регуляция относительного уровня синтеза тяжелых и легких цепей
моноклонального антитела бенрализумаб с использованием промоторов
EEF1A китайского хомячка и гибридного промотора CMV/EEF1A**

Научный руководитель – Орлова Надежда Александровна

Зуйкова Вера Геннадьевна

Сотрудник

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
РАН», Москва, Россия

E-mail: accelerandos@yandex.ru

Введение. Для сборки функциональных IgG критически важен баланс синтеза тяжелых (ТЦ) и легких цепей (ЛЦ), его нарушение может приводить к накоплению свободных цепей, агрегации и снижению выхода целевого продукта. Бицистронные векторы с IRES, не всегда позволяют точно настроить этот баланс. В работе исследовано применение двух-промоторной системы для антитела бенрализумаб: ЛЦ под контролем гибридного промотора CMV/EEF1A1 человека, ТЦ - под промотором EEF1A1 китайского хомячка. Для усиления трансляции в 5'-UTR ЛЦ встроен клеточный IRES p27/WAF, а селективный маркер DHFR экспрессируется с ТЦ через вирусный IRES EMCV. Цель работы - оценить, обеспечивает ли такая конфигурация корректный относительный уровень биосинтеза цепей афукозилированного мкАт бенрализумаб.

Методы. Сконструирована плазида, содержащая две транскрипционные единицы: (1) тяжелая цепь бенрализумаба под контролем промотора EEF1A1, за которой следует IRES EMCV и ген DHFR; (2) легкая цепь под контролем гибридного промотора CMV/EEF1A с элементом клеточного IRES p27/WAF в 5'-нетранслируемой области. Полученным вектором трансфицировали методом электропорации клетки CHO 4BGD FUT8^{-/-}, проводили селекцию и амплификацию целевых генов в присутствии метотрексата. Анализ уровней экспрессии выполняли методом вестерн-блоттинга с использованием антител, специфичных к ТЦ, ЛЦ и Fc-фрагменту IgG, что позволяло дифференцировать свободные цепи и полностью собранные антитела в культуральной среде. Получали минипулы продуцентов после геномной амплификации путем посева клеток в 96-луночные планшеты, варьируя плотность посева от 1250 до 10 000 клеток на лунку. Отбор лунок с единичными колониями проводили микроскопически с последующим переносом в 24-луночные планшеты.

Результаты. Вестерн-блоттинг культуральной среды выявил свободные легкие цепи (ЛЦ), но их уровень не превышал сигнал ЛЦ в составе полных IgG. Тяжелые цепи детектировались только в гетеродимерах H2L2, свободные ТЦ отсутствовали. Основным продуктом были полностью собранные антитела с минимальным уровнем агрегатов. В ходе скрининга культуральной среды минипулов в 24-луночной планшете методом ИФА были выявлены 9 продуктивных минипулов из 24 полученных. Концентрация целевого антитела варьировала от 0,15 до 2,29 мкг/мл, при этом максимальный титр более чем в 15 раз превышал минимальный. По результатам анализа отобрано шесть наиболее продуктивных минипулов.

Выводы. Использование комбинации промоторов гибридного CMV/EEF1A человека и EEF1A китайского хомячка в сочетании с дополнительными IRES-элементами позволяет достичь сбалансированной экспрессии тяжелых и легких цепей бенрализумаба. Предложенная векторная конфигурация может быть рекомендована для разработки промышленных продуцентов рекомбинантных антител.