

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-84

## РАЗРАБОТКА ПЛАТФОРМЕННОЙ ТЕХНОЛОГИИ ТРАНЗИЕНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ В СНО-С DEVELOPMENT OF TRANSIENT CHO-S EXPRESSION PLATFORM

А. С. Казакова, А. А. Еврейская, А. К. Зенкова, Е. А. Стеблева, А. А. Ментова, З. Р. Хасаншина, М. Д. Бочкарёва

*R&D ГЕРОФАРМ, Санкт-Петербург*

А. С. Kazakova, A. A. Evreiskaya, A. K. Zenkova, E. A. Stebleva, A. A. Mentova, Z. R. Khasanshina, M. D. Bochkareva

*R&D GEROPHARM, Saint Petersburg*

✉ anna.kazakova@geropharm.com

### Аннотация

Разработка платформы транзиентной экспрессии в клетках СНО-С направлена на оптимизацию ключевых этапов с целью снижения затрат, повышения выхода и качества рекомбинантного белка. В исследовании проведен отбор оптимальных культуральных сред и трансфектантов, доступных на российском рынке, с учетом критических параметров экспрессии и жизнеспособности клеток. Результаты исследования позволяют стандартизовать и ускорить процесс разработки.

### Abstract

The development of a transient expression platform in CHO-S cells is aimed at optimizing key stages to reduce costs, increase yield, and improve the quality of the recombinant protein. The study involved selecting optimal culture media and transfectants available on the Russian market, taking into account critical parameters of expression and cell viability. The results of the study enable the standardization and acceleration of the development process.

### Введение

Производство терапевтических рекомбинантных белков в фармацевтической промышленности демонстрирует устойчивый рост. На текущий момент свыше 89 % белков, получаемых в клетках млекопитающих, производят с помощью СНО-С (Chinese Hamster Ovary-Suspension) [1]. Эффективным методом получения рекомбинантных белков без создания стабильных клеточных линий является транзиентная экспрессия. Данный метод позволяет сравнивать элементы экспрессионной системы, варианты терапевтических молекул и быстро нарабатывать препартивные количества белка для первичных этапов фармацевтической разработки [2]. Выбор культуральных сред, трансфектантов и условий трансфекции продукт-специфичен, но платформенная технология с предопределенными компонентами может сократить время разработки и позволить оптимизировать ключевые параметры под конкретный продукт.

В данной работе акцент сделан на двух критически важных этапах: подборе оптимальных культуральных сред для клеток СНО-С и оптимизации параметров трансфекции. Среда для культивирования является ключевым элементом, влияющим на жизнеспособность, скорость удвоения, морфологию, предельную плотность клеток и синтез целевого белка. Неоптимальная среда может ухудшать состояние клеток, снижать выход и качество экспрессируемого белка. Эффективность трансфекции влияет на выход целевого продукта, поэтому важно выбрать трансфектант, обеспечивающий высокую эффективность доставки нуклеиновых кислот, воспроизводимость и минимальную цитотоксичность.

В условиях увеличения стоимости и удлинения сроков поставок реагентов на российском рынке проведен скрининг коммерчески доступных культуральных сред и трансфектантов, произведенных в России, Китае и Индии.

**Цель работы** — провести скрининговые сравнения сред для культивирования клеток и трансфицирующих агентов, выбрать лучшие по критическим показателям качества для разработки платформенной технологии транзиентной экспрессии в СНО-С.

### Материалы и методы

В качестве тестируемых сред для культивирования были выбраны среды от Bioengine (B600S, B601S, B100S), Eminence (EmCD CHO101, EmCD CHO121), JSBio (CD CHO011, CD CHO012, CD CHO050), HiMedia. На рис. 1 показана схема экспериментов по тестированию сред. Критериями успешной адаптации к среде являлись: морфология клеток, сохранение скорости роста (удвоение 16–24 ч), поддержание жизнеспособности > 95 %, возможность роста до  $1 \times 10^7$  кл./мл.

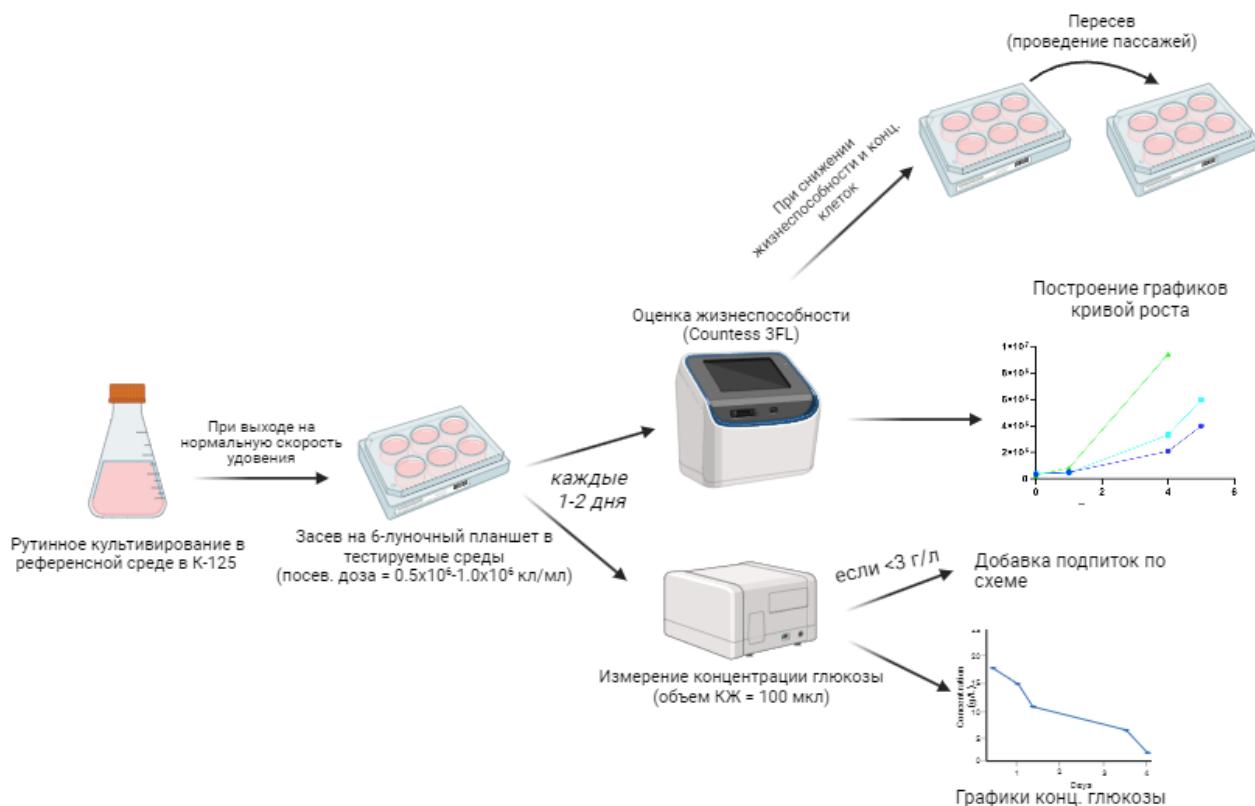


Рис. 1. Схема экспериментов по тестированию сред

Тестируемыми трансфектантами были HighGene Transfection reagent (ABclonal), HighGene plus Transfection reagent (ABclonal), GenJector-39 (Molecta), GenJector-40 (Molecta), PEI 40K (Servicebio), PEI MB10000 (Macklin), RapidTrans CHO Kit (Bioengine), Lipomaster293 Transfection Reagent (Vazyme). Для оценки эффективности трансфекции использовали плазмиду pTagGFP2-N vector, флуоресценцию белка GFP в клетках анализировали проточной цитометрией.

### Результаты

В результате первичного скрининга по критическим параметрам для дальнейшей разработки технологии отобраны 3 среды — EmCD CHO101, EmCD CHO121, CD CHO050 (табл. 1).

Таблица 1  
Сравнение сред для культивирования

Критерий	Тестируемые среды								
	B600S	B601S	B100S	EmCD CHO101	EmCD CHO121	CD CHO 011	CD CHO 012	CD CHO 050	HiMedia
Скорость удвоения, ч	> 24	24	24	20	21	24	24	24	24
Морфология	Стандартная								Конгломераты
Предельная плотность при культивировании в колбах, кл/мл	$4 \times 10^6$	$8 \times 10^6$	$8 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	$9 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$4 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$8 \times 10^6$
Выход из криоконсервации	-	-	-	+	+	-	-	+	-

На основании значений эффективности для последующего анализа влияния трансфектантов на посттрансляционные модификации целевого продукта выбраны 3 системы — RapidTrans CHO Kit, GenJector-39 и PEI 40K (табл. 2).

Определены оптимальные значения таких параметров, как посевная плотность клеток, концентрация ДНК для трансфекции. Данные представлены на графике (рис. 2).

Таблица 2  
Эффективность трансфекции

Трансфектант	Полученная эффективность, %
HighGene	18
HighGene plus	1
GenJector-39	24
GenJector-40	2
PEI 40K	22
Полиэтиленамин MB 10000	0
Rapid Trans CHO Kit	45
Lipomaster 293	0

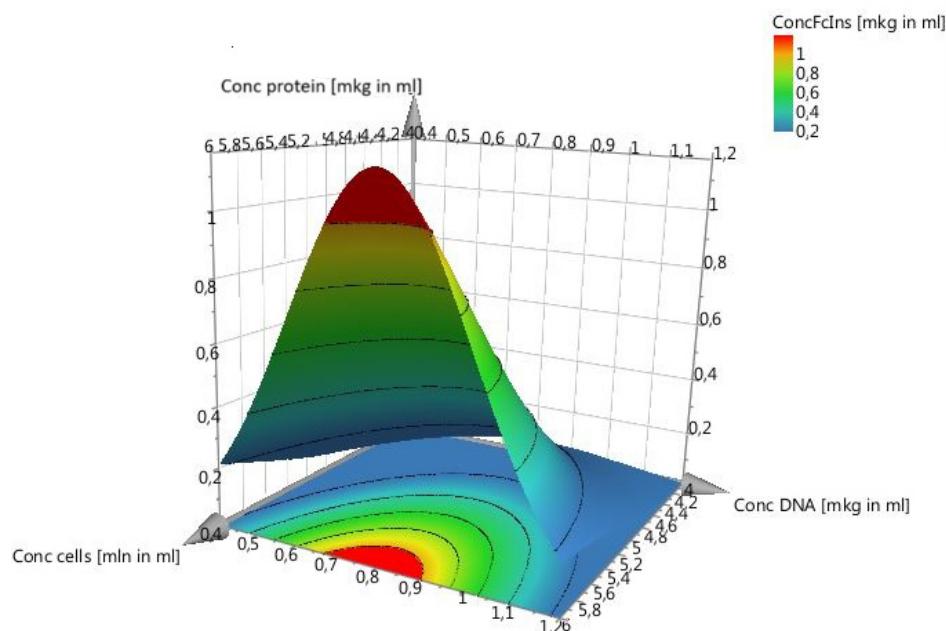


Рис. 2. Зависимость концентрации экспрессируемого белка от варьируемых параметров

### Выводы

Таким образом, проведены скрининговые сравнения сред для культивирования клеток и трансфицирующих агентов. По критическим показателям качества для дальнейшей разработки платформенной технологии транзиентной экспрессии в CHO-S выбраны среды EmCD CHO101, EmCD CHO121, CD CHO050 и трансфектанты Rapid Trans CHO Kit, GenJector-39 и PEI 40K. Процесс описан регрессионным уравнением, позволяющим предсказывать оптимальную посевную плотность и концентрацию ДНК.

### Литература

1. Fu Y., Han Z., Cheng W. et al. Improvement strategies for transient gene expression in mammalian cells // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2024. Vol. 108, No. 1. P. 480.
2. Zhong X., Ma W., Meade C. L. et al. Transient CHO expression platform for robust antibody production and its enhanced N-glycan sialylation on therapeutic glycoproteins // Biotechnol Prog. 2019. Vol. 35, No. 1. P. 2724.