

УДК 57.085.

## Влияние фактора роста фибробластов-2 и других микродобавок на продуктивность клеточных линий-продуцентов IgG и IgA

© 2020 В. В. АРГЕНТОВА<sup>1,\*</sup>, Т. К. АЛИЕВ<sup>1</sup>, М. Э. ГАСПАРЯН<sup>2</sup>, Д. А. ДОЛГИХ<sup>1,2</sup>, М. П. КИРПИЧНИКОВ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997

\*e-mail: vicarg@rambler.ru

Поступила в редакцию 12.08.2019 г.

После доработки 24.10.2019 г.

Принята к публикации 11.02.2020 г.

В настоящее время разработаны и успешно применяются бессывороточные среды для культивирования различных эукариотических клеточных линий. В последнее время, наряду с многочисленными антителами IgG1-изотипа, все чаще появляются терапевтические рекомбинантные антитела IgA, однако, процедура культивирования клеточных линий-продуцентов IgA еще недостаточно оптимизирована. В связи с этим встали задачи по улучшению показателей роста, метаболизма и продуктивности клеточных культур, используемых для получения этих антител. При использовании в качестве стимулятора роста комплексной добавки, содержащей соли цинка и фактора роста фибробластов-2, выявлено ее стимулирующее действие при культивировании клеток в основных средах: DMEM и IMDM. Введение в культуральную среду таких компонентов, как натриевая соль декстрансульфата и цитрат железа, сопровождалось повышением продуктивности стабильных клеточных линий-продуцентов антител IgG и IgA, а также показателей гомогенности и плотности клеточной культуры, что особенно важно при продуцировании антител класса IgA.

*Ключевые слова:* бессывороточные питательные среды, микродобавки, рекомбинантные антитела, фактор роста фибробластов-2

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-1-44-52

Растущие потребности производства терапевтических антител стимулируют исследования по повышению продуктивности клеточных линий млекопитающих. Разработка и совершенствование состава бессывороточных сред и добавок к ним стало одним из основных направлений оптимизации производства терапевтических антител, так как связано не только с увеличением продуктивности клеточных линий, но и с качеством производимых рекомбинантных иммуноглобулинов, степенью очистки белков на производстве, устранением риска контаминации компонентами животного происхождения, служащих потенциаль-

ными источниками различных патогенов. Однако большинство клеток млекопитающих очень чувствительны как к изменениям условий культивирования, так и к количеству и качеству добавок в культивируемые среды. Для обеспечения эффективного культивирования клеток млекопитающих необходимо присутствие всех питательных веществ, таких как аминокислоты, витамины, неорганические добавки [1, 2].

Известно, что добавление к безбелковым и бессывороточным средам таких компонентов, как витамины и аминокислоты, существенно повышает плотность клеточных культур и продукцию

*Список сокращений:* ACR (Anti-Clumping Reagent) – реактив против образования агрегатов и кластеров клеток; CHO (Chinese Hamster Ovarian) – клетки яичника китайского хомячка; DMEM/F12 – среда DMEM с добавлением среды F12; FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2) – фактор роста фибробластов-2; IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) – среда Дульбекко в модификации Искова.

антител [1, 3, 4]. Сообщалось и об увеличении продукции терапевтических белков и улучшении роста клеток при введении в бессывороточную среду добавок, представляющих собой комбинации витаминов и гормонов, а также гормонов и неорганических солей [5], которые и заменили компоненты животного происхождения [6].

В последние годы разработаны стандартные бессывороточные среды для работы с культурами клеток млекопитающих. Необходимо отметить, что различные клеточные линии млекопитающих различаются и по метаболизму, и по особенностям использования питательных веществ [7–9].

В настоящее время для промышленного производства рекомбинантных белков широко используют клетки яичников китайского хомячка (СНО). Несколько модификаций этих клеток разработано специально для повышенной продукции рекомбинантных белков. Подобные специализированные культуры клеток требуют особых сред культивирования – для улучшения метаболизма и продуктивности клеток. Однако среды и добавки, разработанные известными фирмами-производителями для определенной культуры клеток, высоко специализированы и дорогостоящи. Различные культуры клеток требуют разных условий роста, таких как концентрация и соотношение  $O_2/CO_2$ , составы сред и добавок. Кроме того, содержание в питательной среде таких обязательных компонентов, как аминокислоты, органические и неорганические соли, витамины, микроэлементы, сахара, липиды и нуклеиновые кислоты, может различаться, что зависит от типа культур клеток [10].

На плотность клеточной культуры и ее рост влияет множество факторов, при этом некоторые из них могут блокировать рост клеток или вызывать их агрегацию. Клетки СНО, будучи по своей природе адгезионными, при выращивании в виде суспензионной культуры склонны образовывать скопления клеток, как в качалочных колбах, так и в емкостях для перфузионных культур [11]. Для минимизации процесса образования агрегатов обычно используют добавку Anti-Clumping Reagent (ACR) фирмы Gibco (США), но также имеются данные об успешном использовании такой комплексной добавки, как декстрансульфат с рекомбинантным трипсином [12].

Разработано несколько стратегий по подбору состава сред. Один из принципов заключается в выборе и тестировании комбинаций стандартной среды и добавок. В некоторых работах исследовано влияние микродобавок к бессывороточным средам. Особенно важно наличие в составе сред таких микроэлементов, как Zn, Cu и Se, которые необходимы для нормального роста клеточной

культуры и, кроме того, входят в состав ферментов, участвующих в метаболизме клеток [13].

Согласно литературным данным, фактор роста фибробластов-2 (FGF-2) индуцирует миграцию, пролиферацию и дифференцировку эпителиальных клеток и рассматривается в качестве потенциального ангиогенного фактора. FGF-2 также стимулирует пролиферацию фибробластов и участвует в регенерации клеток [14].

Многочисленные исследования подтверждают способность FGF-2 стимулировать пролиферацию эпителиальных клеток роговицы, стромальных фибробластов и эндотелиальных клеток *in vitro*, а также в культуре клеток и системах по выращиванию органов в культуре [15–17]. FGF-2 оказывает влияние на рост клеток роговицы и стволовых клеток [15].

Большинство работ по изучению экспрессии в клетках млекопитающих и разработке терапевтических антител проведено для иммуноглобулинов класса G (IgG). Однако за последние несколько лет значительно возрос интерес к получению терапевтических антител на основе иммуноглобулина A (IgA) [18]. Это связано с тем, что IgA играет ключевую роль в активации иммунитета на слизистых оболочках. Именно поэтому к одному из преимуществ использования антител IgA в качестве терапевтического средства относится возможность их мукозального применения. В связи с этим большое практическое значение приобретает оптимизация методов продукции рекомбинантных молекул IgA.

В предыдущие годы исследований по экспрессии и получению терапевтических IgA было немного, что связано с недостаточно разработанными методами продуцирования, очистки антител и вытекающими отсюда трудностями для получения рекомбинантных антител в количествах, достаточных для исследований *in vivo*. По сравнению с IgG степень гликозилирования антител IgA гораздо выше, причем их гликаны имеют преимущественно трехантенную структуру [19, 20]. Также IgA1, в отличие от IgA2 и IgG1, содержит O-гликаны, число которых варьирует от трех до пяти [21]. Эти особенности структуры IgA могут быть причиной повышенной способности к образованию агрегатов, что ограничивает их широкое применение [22].

В связи с этим особенное значение приобретают исследования, направленные на усовершенствование состава основных сред и получение многокомпонентных добавок, позволяющих достигать высокой продуктивности клеточных линий, экспрессирующих терапевтические антитела в формате IgG и IgA. Для изучения влияния добавок на продуктивность мы использовали стабильные клеточные линии, продуцирующие IgG и

IgA, которые относятся к различным классам иммуноглобулинов. Стабильные клеточные линии, продуцирующие IgA, были представлены линиями-продуцентами IgA1 и IgA2m1, которые относятся к разным подклассам IgA.

Цель работы заключалась в исследовании влияния FGF-2 и комбинаций микродобавок на рост клеток-продуцентов СНО и продолжительность времени их культивирования в основных средах. Это создаст платформу для дальнейшей оптимизации экспрессии IgA и IgG в клетках СНО. В задачи исследования входило изучение влияния комбинации FGF-2 и сульфата цинка на пролиферативную активность клеток СНО, а также декстрансульфата с цитратом цинка на продуктивность стабильных клеточных линий-продуцентов различных классов иммуноглобулинов.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Стабильные клеточные линии и среды

В работе использовали стабильные клеточные линии, полученные на основе клеток СНО DG44 (dhfr-) (Thermo Fisher Scientific, США) [23, 24] и продуцирующие рекомбинантные моноклональные антитела подклассов IgG1, IgA1 и IgA2. Клетки высевали в концентрации  $3.0 \times 10^5$  кл./мл в качалочные колбы Optimum Growth (Thomson Instrument Company, США), которые предназначены для выращивания клеток млекопитающих. Объем культуры составлял 25 мл.

Культуры клеток, продуцирующие рекомбинантные моноклональные антитела, выращивали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 96% влажности, 37 °С и 8% CO<sub>2</sub> с ротационным перемешиванием со скоростью 130 об/мин. Культивирование стабильных клеточных линий проводили методом статических культур.

Для культивирования использовали стандартные основные среды: IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) и DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) – с добавлением 200 мМ L-глутамин (Gibco, США и «ПанЭко», Россия), 10% Pluronic (Gibco).

В качестве добавок-стимуляторов роста использовали FGF-2, полученный в лаборатории инженерии белка ИБХ РАН [25], и 100× добавку инсулин-трансферрин-селенит (ITS) фирмы Gibco, в которой концентрация инсулина составляет 1,0 г/л, трансферрина – 0,55 г/л, селенита натрия – 0,00067 г/л.

В качестве микродобавок применяли раствор сульфата цинка, а также комбинацию сульфата цинка и FGF-2. Стерильный раствор сульфата цинка в фосфатно-солевом буфере (PBS) добавляли до

конечной концентрации 25 мкМ, а раствор FGF-2 – до конечной концентрации 16,8 и 33,6 нг/лунка.

Препарат 100× ACR фирмы Gibco использовали в экспериментах по устранению агрегатов в культуре. Натриевую соль декстрансульфата использовали в конечной концентрации 50 мкг/мл, а комбинацию из компонентов вводили в двух вариантах: декстрансульфат в конечной концентрации 150 мкг/лунка плюс цитрат железа в конечных концентрациях 1 мМ или 0,5 мМ.

В качестве антибиотика/антимикотика использовали готовую смесь: antibiotic-antimycotic 100× (Thermo Fisher Scientific, Gibco, США), содержащую 10 000 ед/мл пенициллина, 10 000 мкг/мл стрептомицина, 25 мкг/мл амфотерицина В.

### Определение концентрации и жизнеспособности клеток

Измерение концентрации клеток и их жизнеспособности проводили с использованием 0,04%-ного раствора трипанового синего в камере Горяева с использованием инвертированного микроскопа. Плотность клеток рассчитывали по формуле:

$$TCD = \frac{N \cdot 1,1 \cdot 10^5}{15}, \quad (1)$$

где  $TCD$  – плотность клеток (кл/мл),  $N$  – число клеток в 15 средних квадратах камеры Горяева.

Жизнеспособность клеточных культур рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{N_v}{N} \cdot 100, \quad (2)$$

где  $V$  – жизнеспособность клеток (процент жизнеспособных клеток в культуре), а  $N_v$  – число неокрашенных клеток в 15 средних квадратах камеры Горяева.

### Иммуноферментный анализ

Концентрацию экспрессируемых IgG и IgA определяли методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА). В 96-луночные планшеты (Microlon, High Binding; Greiner BioOne, Германия) вносили моноклональные антитела мыши к каппа-домену легкой цепи IgG человека («Биалекса», Россия) в расчете 0,5 мкг/лунка. При определении продуктивности для выявления антител класса IgA использовали меченные пероксидазой хрена козы антитела, специфичных к α-цепи IgA человека (goat anti-human IgA (α-chain specific) peroxidase; Sigma, США). Для выявления антител класса IgG использовали меченные пероксидазой хрена козы антитела против IgG человека (goat anti-human IgG (whole molecule) peroxidase; Sigma). В качестве стандартных образцов использовали IgA и IgG из сыворотки человека (Sigma).

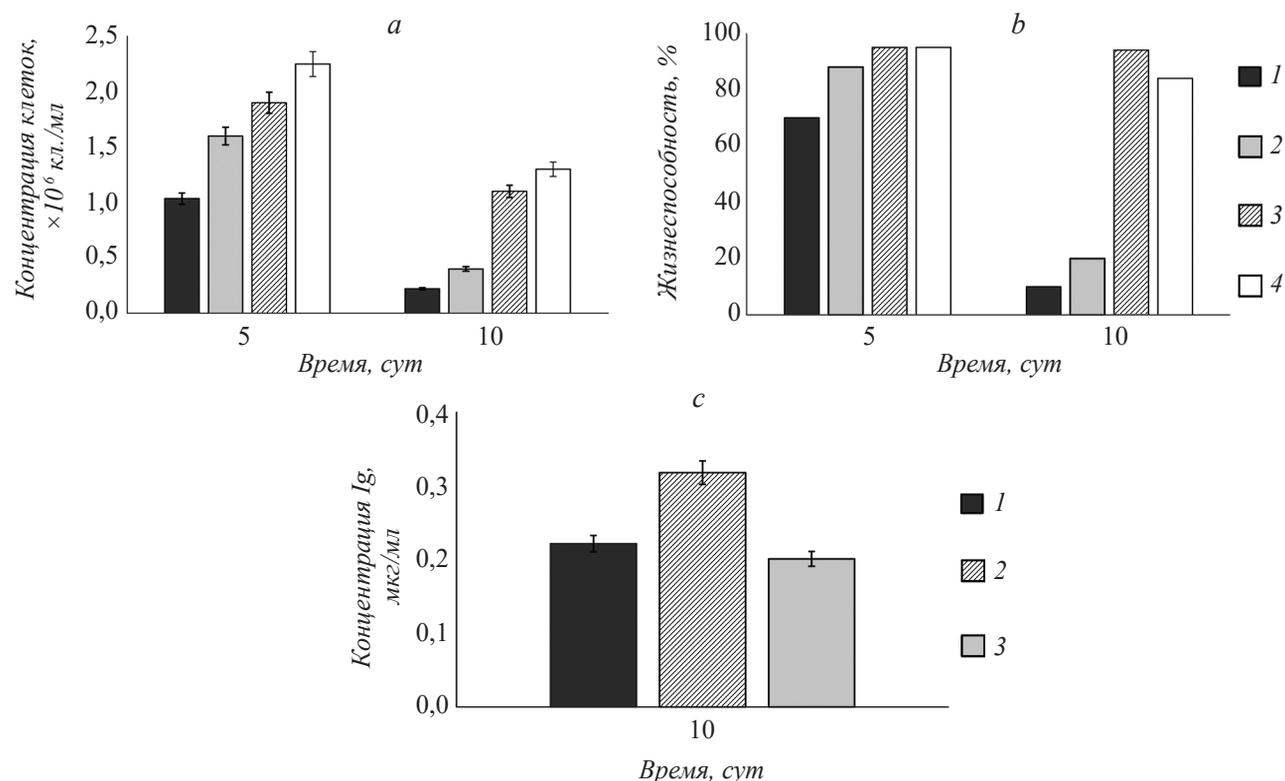
**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Выбор стабильных моноклональных клеточных линий – продуцентов IgG1, IgA1- и IgA2m1-изотипов антител к вирусу гриппа А – был основан на существенных отличиях в характере экспрессии IgG и IgA в клетках млекопитающих и их гликозилировании. Эти стабильные клеточные линии отличаются друг от друга по параметрам роста, плотности культуры, образованию агрегатов клеток, структуре, характеру гликозилирования, что неизбежно влияет на их эффективность как продуцентов терапевтических антител [26, 27].

**Влияние FGF-2 на пролиферативную активность клеток, жизнеспособность и продуктивность стабильных клеточных линий, продуцирующих антитела IgA2m1 и IgG1**

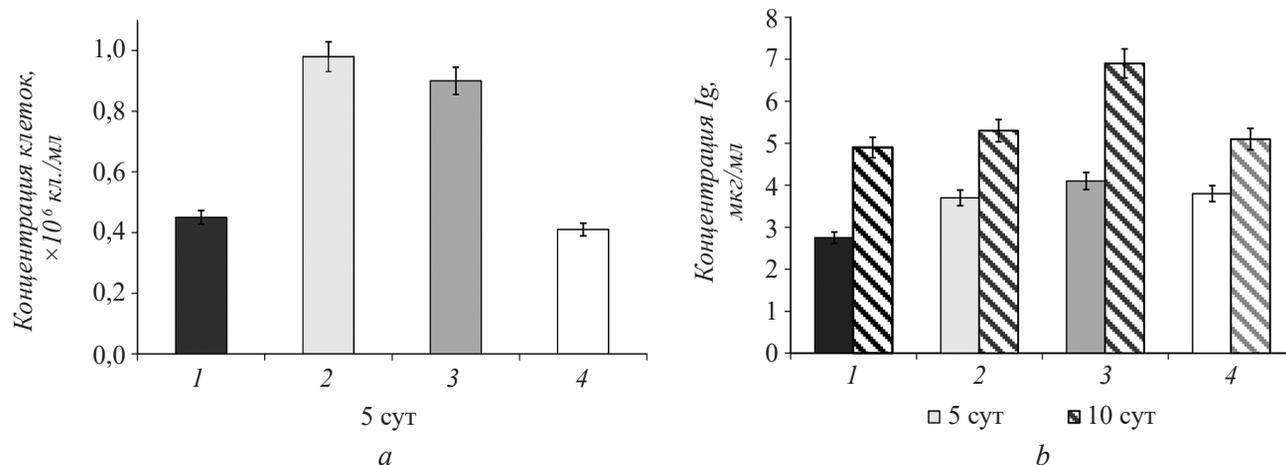
Нами исследовано влияние FGF-2, добавляемого в среду в качестве стимулятора роста, на рост клеточных культур-продуцентов антител IgG1- и IgA2m1-изотипов. Для сравнения влияния на рост клеточных культур-продуцентов ан-

тител в качестве стимулятора роста использовали также широко известную добавку ITS. Выявлено, что при культивировании клеточной культуры-продуцента IgA2m1 в среде DMEM/F12 добавка FGF-2 приводит к повышению плотности клеточной культуры на пятые сутки. Следует сказать, что при этом увеличение скорости роста клеток было дозозависимым: при концентрации FGF-2 в культуре 5,6 нг/мл плотность культуры составляла  $1,98 \cdot 10^6$  кл./мл, а при концентрации 11,2 нг/мл –  $2,25 \cdot 10^6$  кл./мл. В то же время плотность клеточных культур, выращиваемых только в среде DMEM/F12 (контрольный образец) и в среде с добавлением ITS, составляла  $1,03 \cdot 10^6$  кл./мл и  $1,62 \cdot 10^6$  кл./мл соответственно. Таким образом, по сравнению с образцом, культивируемым в среде с добавлением ITS, плотность культуры при добавлении FGF-2 в концентрациях 5,6 нг/мл и 11,2 нг/мл повышалась на 29% и 47% соответственно (рис. 1а). Более значимое увеличение плотности культуры клеток по сравнению с контрольным образцом наблюдалось на 10 сутки культивирования: плотность культуры увеличивалась



**Рис. 1.** Влияние FGF-2 в среде культивирования на концентрацию клеток (а), жизнеспособность стабильной клеточной линии, продуцирующей рекомбинантные моноклональные антитела IgA2m1-изотипа (b), и ее продуктивность (c). На видах (а) и (b): 1 – DMEM/F12 (контроль), 2 – DMEM/F12 + ITS, 3 – DMEM/F12 + FGF-2 (5,6 нг/мл), 4 – DMEM/F12 + FGF-2 (11,2 нг/мл). На виде (c): 1 – DMEM/F12 (контроль), 2 – DMEM/F12 + FGF-2 (5,6 нг/мл), 3 – DMEM/F12 + ITS

**Fig. 1.** Effect of FGF-2 on the cell concentration (a), viability (b) and productivity (c) of stable cell line producing recombinant monoclonal antibody of IgA2m1-isotype. (a, b): 1 – DMEM/F12 (control), 2 – DMEM/F12 + ITS, 3 – DMEM/F12 + FGF-2 (5,6 ng/mL), 4 – DMEM/F12 + FGF-2 (11,2 ng/mL). (c): 1 – DMEM/F12 (control), 2 – DMEM/F12 + FGF-2 (5,6 ng/mL), 3 – DMEM/F12 + ITS



**Рис. 2.** Влияние FGF-2 в основной среде на концентрацию клеток (а) и продуктивность (b) стабильной клеточной линии, продуцирующей рекомбинантные моноклональные антитела подкласса IgG1. 1 – IMDM (контроль), 2 – IMDM + ITS, 3 – IMDM + FGF-2 (5,6 нг/мл), 4 – IMDM + FGF-2 (11,2 нг/мл)

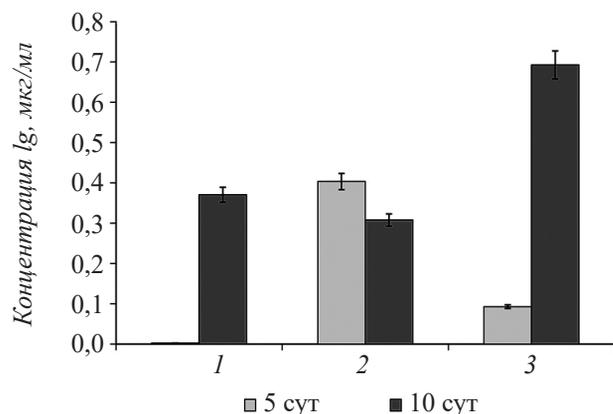
**Fig. 2.** Effect of FGF-2 on concentration (a) and productivity (b) of the stable cell line producing recombinant monoclonal antibody of IgG1 isotype. 1 – IMDM (control), 2 – IMDM + ITS, 3 – IMDM + FGF-2 (5,6 ng/mL), 4 – IMDM + FGF-2 (11,2 ng/mL)

в 6 раз при концентрации FGF-2 в среде 5,6 нг/мл и в 6,7 раз при концентрации 11,2 нг/мл.

В то же время результаты эксперимента по изучению влияния FGF-2 на плотность культуры-продуцента IgG1 отличались от данных, полученных на клеточной культуре-продуценте IgA2m1. Добавление как FGF-2 в концентрации 5,6 нг/мл, так и раствора ITS оказывало одинаковый эффект: происходило двукратное увеличение плотности культуры клеток по сравнению с контролем. Интересно, что при повышении концентрации FGF-2 в два раза (11,2 нг/мл) плотность культуры и концентрация клеток оставалась на уровне контроля (рис. 2а).

FGF-2 в обеих концентрациях оказывал такое же положительное действие на жизнеспособность культуры клеток-продуцента IgG1 (до 95% жизнеспособности через 5 и 9 сут), как и на стабильную клеточную линию-продуцент IgA2m1 (см. рис. 1b), поэтому данные по жизнеспособности клеток для этой клеточной линии не приводятся.

Использование в качестве добавки FGF-2 в концентрации 5,6 нг/мл повышало продуктивность стабильной клеточной линии по сравнению с контрольным образцом в 1,5 раза на 10-е сутки культивирования, тогда как применение ITS и FGF-2 в концентрации 11,2 нг/мл не влияло на продуктивность (см. рис. 2b).



**Рис. 3.** Влияние комбинации FGF-2 и сульфата цинка на продуктивность стабильной клеточной линии-продуцента рекомбинантных моноклональных антител IgA2mL. 1 – IMDM; 2 – IMDM + сульфат цинка; 3 – IMDM + сульфат цинка + FGF-2

**Fig. 3.** Effects of FGF-2 and zinc sulfate on productivity of the stable cell line producing IgA2m1 recombinant monoclonal antibody. 1 – IMDM; 2 – IMDM + zinc sulfate; 3 – IMDM + zinc sulfate + FGF-2

### Влияние комбинации FGF-2 с сульфатом цинка на продуктивность стабильной клеточной линии, продуцирующей антитела IgA2m1-изотипа

Из литературных данных известно, что добавление сульфата цинка в среду культивирования увеличивает продукцию IgG [28]. Продукцию IgA2 исследовали, используя в качестве добавки к основной среде или только раствор сульфата цинка, или его комбинации с FGF-2. В качестве контроля брали культуру клеток-продуцентов IgA2m1, выращиваемую в основной среде IMDM без добавок.

При использовании в качестве добавки к среде комбинации FGF-2 и сульфата цинка (рис. 3) продукция IgA2-антител увеличивалась в 1.86 раз по сравнению с контрольным образцом (рис. 3). Введение в среду культивирования только сульфата цинка практически не влияло на продуктивность клеточной линии, в то время как добавление FGF-2 в сочетании с сульфатом цинка в среду

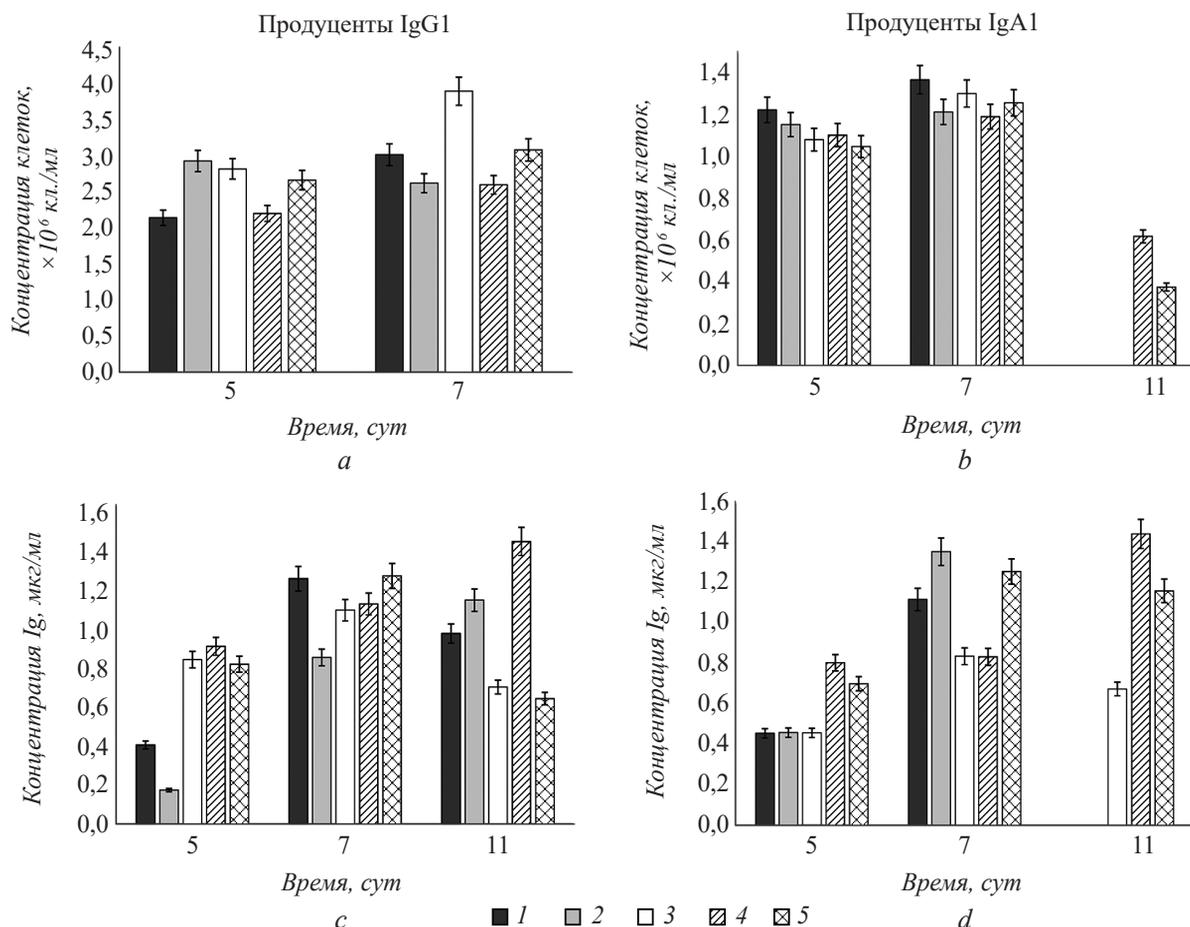
увеличивала продуктивность в 2 раза по сравнению с использованием в качестве добавки только FGF-2. Этот синергетический эффект может быть связан как с действием FGF-2, который способствует повышению плотности и увеличению времени жизни клеток, так и со стимулирующим влиянием сульфата цинка на продуктивность клеток. Известно, что действие цинка на клетки связано с повышением стабильности мРНК – или путем изменения ее вторичной структуры, или через облегчение связывания с ней стабилизирующих белков [29, 30].

**Влияние декстрансульфата и его комбинации с цитратом железа на пролиферативную активность и продуктивность стабильных клеточных линий-продуцентов IgG1 и IgA1**

Изучение влияния микродобавок в среде культивирования на продуцирование двух подклассов иммуноглобулинов, IgG1 и IgA1, имеет свои нюансы, что связано с особенностями культивиро-

вания IgG и IgA в суспензионных культурах. При продолжительном культивировании стабильных клеточных линий, в особенности продуцентов IgA, образуются клеточные агрегаты, что приводит к снижению продуктивности. В связи с этим исследования, направленные на получение однородной суспензионной культуры для их продуцирования, очень актуальны.

Для изучения компонентов, повышающих однородность суспензионной культуры, мы использовали стабильные клеточные линии, продуцирующие разные классы иммуноглобулинов: IgG и IgA. При анализе влияния декстрансульфата и его комбинации с цитратом железа на образование агрегатов в обоих вариантах клеточных культур при культивировании в течение 11 сут показано, что на седьмые сутки в контрольных образцах и образцах, содержащих ACR, формировались крупные кластеры агрегированных клеток, в то время как культуры клеток с исследуемыми добавками имели однородный суспензионный формат (рис. 4).



**Рис. 4.** Влияние декстрансульфата и цитрата железа на рост (a, b) и продуктивность (c, d) стабильных клеточных линий-продуцентов IgG1 (a, c) и IgA1 (b, d). 1 – IMDM (контроль), 2 – IMDM + ACR, 3 – IMDM + декстрансульфат, 4 – IMDM + декстрансульфат + 1 мМ цитрат железа, 5 – IMDM + декстрансульфат + 0,5 мМ цитрат железа

**Fig. 4.** Effects of dextran sulfate and iron citrate on growth (a, b) and productivity (c, d) of the stable cell lines producing IgG1 (a, c) and IgA1 (b, d). 1 – IMDM (control), 2 – IMDM + Anti-Clumping Reagent, 3 – IMDM + dextran sulfate, 4 – IMDM + dextran sulfate + 1 mM iron citrate, 5 – IMDM + dextran sulfate + 0,5 mM iron citrate

Следует отметить и различия для клеточных линий-продуцентов антител подклассов IgG1 и IgA1. Так, наибольшая плотность клеточной линии-продуцента антител IgG1,  $3,9 \times 10^6$  кл./мл, была достигнута при выращивании в среде с добавкой только декстрансульфата в конечной концентрации 50 мкг/мл (без цитрата железа). Это достаточно высокий показатель при культивировании в среде без дополнительных питательных добавок. В то же время введение в среду комбинаций микродобавок: цитрата железа в конечной концентрации 0,5 или 1 мМ и натриевой соли декстрансульфата (50 мкг/мл) – не оказывало влияния на плотность клеточных культур, продуцирующих IgG1, в течение всего периода культивирования (рис. 4а). При непродолжительном времени культивирования (5–7 суток) клеточной линии-продуцента антител подкласса IgA1, как с добавками, так и без них, не выявлено значимых изменений плотности культуры клеток. Однако при более продолжительном культивировании показано позитивное влияние комбинации декстрансульфата (конечная концентрация 50 мкг/мл) и цитрата железа в двух исследованных концентрациях. Так, на 11-е сут культивирования на этих средах клетки линии-продуцента антител IgA1 продолжали расти и сохраняли жизнеспособность не менее 90%, в то время как рост других образцов прекращался и жизнеспособность снижалась до 40% (рис. 4б). Самый высокий показатель продуктивности клеточной линии-продуцента IgA1 достигнут при культивировании в среде с добавлением натриевой соли декстрансульфата в конечной концентрации 50 мкг/мл и цитрата железа в конечной концентрации 1 мМ. Продуктивность этой клеточной линии, культивируемой в среде с применением вышеуказанной комбинации, превосходила таковую для образцов с добавкой только декстрансульфата или комбинации его с цитратом железа в концентрации 0,5 мМ: на 62% и 33% соответственно – на 11-е сут культивирования (рис. 4д). Аналогичные результаты получены и для клеточной линии-продуцента антител подкласса IgG1, где продуктивность стабильной клеточной линии, выращиваемой в среде с применением декстрансульфата и цитрата железа в конечной концентрации 1 мМ, превосходила контрольный и другие образцы (рис. 4с).

Таким образом, показано, что применение в качестве добавки к культуральной среде композиции натриевой соли декстрансульфата в конечной концентрации 50 мкг/мл и цитрата железа в конечной концентрации 1 мМ повышает продуктивность и увеличивает продолжительность жизни клеточных линий-продуцентов IgG1 и IgA1 благодаря улучшению суспензионных свойств культу-

ры по сравнению с применением препарата АСР. Следует отметить, что положительный эффект вышеупомянутой комплексной добавки был особенно выражен при культивировании стабильной клеточной линии-продуцента IgA1.

Итак, влияние FGF-2 на пролиферацию клеток и продолжительность жизни стабильных клеточных линий, продуцирующих рекомбинантные моноклональные антитела различных подклассов IgG и IgA, оказалось различным. Добавка FGF-2 к основной среде оказывала наибольшее положительное влияние на культивирование клеточной линии-продуцента IgA2m1.

Использование в качестве добавки к основной среде комбинации FGF-2 с сульфатом цинка также приводило к повышению продуктивности стабильной клеточной линии-продуцента IgA2m1.

Применение в качестве добавки к основной среде композиции натриевой соли декстрансульфата и цитрата железа улучшало суспензионные свойства культуры за счет уменьшения образования агрегатов клеток, увеличивало продолжительность жизни клеточных культур и повышало их продуктивность. Эта комплексная добавка была наиболее эффективна при добавлении к среде для культивирования стабильной клеточной линии-продуцента IgA1.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 14.607.21.0177). Уникальный идентификатор проекта – RFMEFI60717X017

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ducommun P., Ruffieux P., Stockar U.V. The role of vitamins and amino acids on hybridoma growth and monoclonal antibody production. *Cytotechnology*, 2001, 37(2), 65–73. doi: 10.1023/A:1019956013627
2. Sunstrom N.S., Gay R.D., Wong D.C., et al. Insulin-like growth factor-I and transferrin mediate growth and survival of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Progr.*, 2000, 16(5), 698–702. doi: 10.1021/bp000102t
3. Takagi M., Hia H.C., Jang J.H., Yosida T. Effects of high concentrations of energy sources and metabolites on suspension culture of Chinese hamster ovary cells producing tissue plasminogen activator. *J. Biosci. Bioeng.*, 2001, 91(5), 515–521.
4. Ishaque A., Al-Rubeai M. Role of vitamins in determining apoptosis and extent of suppression by bcl-2 during hybridoma cell culture. *Apoptosis*, 2002, 7(3), 231–239. doi: 10.1023/A:1015343616059

5. Morris A.E., Schmidt J. Effects of insulin and LongR3 on serum-free Chinese hamster ovary cell cultures expressing two recombinant proteins. *Biotechnol. Progr.*, 2000, 16(5), 693–697. doi: 10.1021/bp0000914
6. Kim D.Y., Lee J.C., Chang Y.N., Duk J. O. Effects of supplementation of various medium components on Chinese hamster ovary cell cultures producing recombinant antibody. *Cytotechnology*, 2005, 47(1–3), 37–49. doi: 10.1007/s10616-005-3775-2
7. Zhang H., Wang H., Liu M., et al. Rational development of a serum-free medium and fed-batch process for a GS-CHO cell line expressing recombinant antibody. *Cytotechnology*, 2013, 65(3), 363–378. doi: 10.1007/s10616-012-9488-4
8. Salazar M., Keusgen M., von Hagen J. Amino acids in the cultivation of mammalian cells. *Amino Acids*, 2016, 48, 1161–1171. doi: 10.1007/s00726-016-2181-8
9. Yao T., Asayama Y. Animal-cell culture media: history, characteristics, and current issues. *Reprod. Med. Biol.*, 2017, 16(2), 99–117. doi: 10.1002/rmb2.12024
10. Yang Z., Xiong H-R. Culture conditions and types of growth media for mammalian cells. In: *Biomedical Tissue Culture*, Ed. Ceccherini-Nelli, chapter 1, 2012. doi: 10.5772/52301
11. Mielle L., Goudar C.T. Gene expression profiling for medianicstic understanding of cellular aggregation in mammalian cell perfusion cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 2013, 110(2), 483–490. doi: 10.1002/bit.24730
12. Jing Y., Zhang C., Fu T., Jiang C., et al. Combination of dextran sulfate and recombinant trypsin on aggregation of Chinese hamster ovary cells. *Cytotechnology*, 2016, 68(2), 241–248. doi: 10.1007/s10616-014-9774-4
13. Arora M. Cell culture media: a review. *Mater. Methods*, 2018, 3(175), 1–18. doi: 10.13070/mm.en.3.175
14. Dow J.K., deVere White R.W. Fibroblast growth factor 2: its structure and property paracrine function tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions. *Urology*, 2000, 55(6), 800–806. doi: 10.1016/s0090-4295(00)00457-x
15. Giguere L., Cheng J, Gospodarowicz D. Factors involved in the control of proliferation of bovine corneal endothelial cells maintained in serum-free medium. *J. Cell Physiol.*, 1982, 110(1), 72–80.
16. Sun P., Shen L., Zhang C., et al. Promoting the expansion and function of human corneal endothelial cells with an orbital adipose-derived stem cell-conditioned. *Stem Cell Res. Ther.*, 2017, 8(1), 287–296. doi: 10.1186/s13287-017-0737-5
17. Chmielowiec J., Borowiak M. *In vitro* differentiation and expansion of human pluripotent stem cell-derived pancreatic progenitors. *Rev. Diabet Stud.*, 2014, 11(1), 19–34. doi: 10.1900/RDS.2014.11.19
18. Beyer T., Lohse S., Berger S., et al. Serum-free production and purification of chimeric IgA antibodies. *J. Immunol. Methods*, 2009, 346(1–2), 26–37. doi: 10.1016/j.jim.2009.05.002
19. Miyamoto S., Ruhaak L.R., Huang J., Stroble C., Leiserowitz G.S., Lebrilla C. Heterogeneity and site identification of N-glycans attached to IgG and IgA isolated from ovarian cancer malignant ascites fluids. *J. Proteome Res.*, 2018, 17(1), 222–223. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00541
20. Woof J.M., Mestecky J. Mucosal immunoglobulins. *Immunol. Rev.*, 2005, 206(1), 64–82. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00290.x20
21. Yoo E.M., Yu L.J., Wims L.A., et al. Differences in N-glycan structures found on recombinant IgA1 and IgA2 produced in murine myeloma and CHO cells. *MAbs*, 2010, 2(3), 320–334.
22. Plomp R., de Haan N., Bondt A., Murli J., Dotz V., Wuhrer M. Comparative glycomics of immunoglobulin A and G from saliva and plasma reveals biomarker potential. *Front. Immunol.*, 2018, 9, 2436. doi: 10.3389/fimmu.2018.02436
23. Argentova V.V., Aliev T.K., Toporova V.A., Rybchenko V.S., Dolgikh D.M., Kirpichnikov M.P. Studies on the influence of different designs of eukaryotic vectors on the expression of recombinant IgA. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, 2017, 72(2), 63–68. doi: 10.3103/S0096392517020018
24. Argentova V.V., Aliev T.K., Zarubaev V.V., Klotchenko S.A., Shtro A.A., Sergeeva M.V., Toporova V.A., Dolgikh D.A., Sveshnikov P.G., Vasin A.V., Kirpichnikov M.P. *In vitro* antiviral activity of recombinant antibodies of IgG and IgA isotypes to hemagglutinin of the influenza A virus. *Mol. Biol. (Mosk.)*, 2017, 51(6), 927–937. doi: 10.7868/S0026898417060052
25. Gasparian M.E., Elistratov P.A., Drize N.I., et al. Overexpression in *Escherichia coli* and purification of human fibroblast growth factor (FGF-2). *Biochemistry (Mosc.)*, 2009, 74(2), 221–255.
26. Woof J.M., Kerr M.A. The function of immunoglobulin A in immunity. *J. Pathol.*, 2006, 208(2), 270–282. doi: 10.1002/path.1877
27. Woof J.M., Russell M.W. Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunol.*, 2011, 4(6), 590–597. doi: 10.1038/mi.2011.39
28. Zuqueli R., Prieto C., Etcheverrigaray M.K., et al. Effect of sodium butyrate and zinc sulphate supplementation on recombinant human INF- $\beta$  production by mammalian cell culture. *Latin American Appl. Res.*, 2006, 36, 321–327.
29. Cao H. Expression, purification and biochemical characterization of antiinflammatory tristetraprolin: a zinc-dependent mRNA binding protein affected by posttranslational modifications. *Biochemistry*, 2004, 43(43), 13724–13738.
30. Harford J., Klausner R.D. Coordinate post-transcriptional regulation of ferritin and transferrin receptor expression: the role of regulated RNA-protein interaction. *Enzyme*, 1990, 44(1–4), 28–41.

## Effects of fibroblast growth factor-2 and other microsupplements on the productivity of IgG and IgA producing cell lines

V. V. ARGENTOVA<sup>1,\*</sup>, T. K. ALIEV<sup>1</sup>, M. E. GASPARIAN<sup>2</sup>, D. A. DOLGIKH<sup>1,2</sup>,  
M. P. KIRPICHNIKOV<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

<sup>2</sup>*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

\**e-mail*: vicarg@rambler.ru

Received August 12, 2019

Revised October 24, 2019

Accepted February 11 2020

**Abstract**—Recently, serum-free media have been developed and successfully used for the cultivation of various eukaryotic cell lines. At present, along with antibodies of the IgG1 isotype, therapeutic recombinant IgA antibodies are appearing in increasing frequency. However, the procedure of cultivation of cell lines producing this class of antibodies has not been optimized yet. For this reason, effects of several compounds used as additives in the culture medium on a growth and productivity of cell lines expressing antibodies were analyzed. A supplement containing the zinc salt and fibroblast growth factor-2 was shown to have stimulating effect on immunoglobulin producing cells during their cultivation in basic media, DMEM and IMDM. A complex additive, comprising dextran sulfate and iron citrate, increased the productivity of stable cell lines producing IgG and IgA antibodies and improved the homogeneity and density of cell cultures, which is especially important when producing antibodies of the IgA class.

**Keywords**: serum-free medium, microsupplements, recombinant antibodies, fibroblast growth factor-2

**Funding**—This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of Russian Federation (grant No 14.607.21.0177, ID: RFMEFI60717X0177).

**doi**: 10.21519/0234-2758-2020-36-1-44-52