

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.218

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ВЕКТОРОВ РАЗЛИЧНЫХ КОНСТРУКЦИЙ НА ЭКСПРЕССИЮ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ IgA1-ИЗОТИПА

В.В. Аргентова^{1, *}, Т.К. Алиев³, В.А. Топорова⁴, В.С. Рыбченко²,
Д.А. Долгих⁴, М.П. Кирпичников¹¹Кафедра биоинженерии и ²кафедра биохимии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,

Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

³кафедра химической энзимологии, химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,

Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3;

⁴Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

*e-mail: vicarg@rambler.ru

Терапевтические препараты антител по применению и производству занимают на мировом фармацевтическом рынке второе место после вакцин. Наиболее распространенными терапевтическими антителами являются моноклональные антитела (МАт) IgG-изотипа, продуцируемые в эукариотических клетках CHO. В последнее время значительный интерес вызывает возможность разработки терапевтических препаратов на основе антител IgA-изотипа, способных проявлять широкий спектр эффекторных функций на слизистых оболочках человека. Для исследования уровня экспрессии иммуноглобулинов А (IgA) в клетках млекопитающих был сконструирован набор бипромоторных (CMV, EF1 α) векторов, содержащих вариабельные области тяжелой и легкой цепей человеческого антитела FI6v3 против гемагглютинаина вируса гриппа А, константные домены IgA1 тяжелой и легкой (каппа-типа) цепей антитела человека. Полученные экспрессионные векторы отличались друг от друга различной ориентацией промоторов, а также наличием или отсутствием интронов. Два варианта полноразмерных тяжелых и легких цепей были клонированы в экспрессионный вектор в однонаправленной и разнонаправленной ориентациях. Полученными плазмидами трансфицировали клетки CHO-DG44 и HEK-293T. Уровень продукции антител был определен при помощи иммуоферментного анализа для стабильной трансфекции клеток CHO-DG44 и HEK-293T. Результаты экспериментов свидетельствуют о существенном увеличении продукции антител FI6v3-IgA1 при трансфекции эукариотических клеток плазмидой pBiPr-ABIgA1FI6-Iht с интронами в тяжелой цепи IgA1 и с однонаправленной ориентацией промоторов.

Ключевые слова: бипромоторный вектор, вирус гриппа А, интроны, ориентация промоторов, эукариотическая экспрессия, моноклональные антитела IgA1

В последнее время иммунотерапия с использованием рекомбинантных антител становится всё более распространенной. Методы продукции и очистки антител человека изотипа IgG1 хорошо изучены и широко применяются, однако в последние годы увеличивается внимание и к применению антител изотипа IgA в связи с их высоким потенциалом для терапии инфекционных и опухолевых заболеваний [1].

Хотя функционально IgA сходен с IgG, основной функцией IgA является защита слизистых оболочек дыхательной, пищеварительной и мочеполовой систем. Молекулярная структура мономерного IgA (гетеротетрамер H₂L₂) близка к строению антител других изотипов [2]. В сыворотке крови антитела изотипа IgA преимущественно мономерны,

однако на слизистых оболочках функционируют как димеры, образующиеся за счёт дисульфидных связей на С-концах тяжелых цепей, J-цепи и секреторного компонента. Антитела IgA имеют оба сайта N- и O-гликозилирования [3], что накладывает некоторые ограничения на выбор систем для их продукции

Важным представляется тот факт, что именно димерные IgA-антитела выполняют особые эффекторные функции, что выгодно отличает их от мономерных форм IgA и IgG.

Антитела IgA связываются с другим набором клеточных рецепторов по сравнению с антителами IgG и поэтому их фармакокинетика выгодно отличается от таковой для IgG [4]. Было показано, что антитела IgA обладают более выраженной спо-

способностью, чем антитела IgG, уменьшать образование вирусных бляшек с гетерологичными подтипами вирусов гриппа. Это подтверждает разницу в антивирусном потенциале IgA и IgG [5]. Ранее было показано, что IgA может очень эффективно нейтрализовать вирусы в вирус-инфицированных секреторных эпителиальных клетках. Поэтому выраженное участие IgA-антител в иммунном ответе может быть особенно важным в случае высокопатогенных штаммов, когда наибольшие осложнения связаны с неконтролируемыми воспалительными реакциями [6, 7].

Однако, несмотря на уникальные характеристики и терапевтический потенциал, антитела IgA исследованы не очень подробно. Основными проблемами, затрудняющими работу с ними, являются недостаточная разработанность методов биосинтеза и очистки, а также трудности с получением достаточного количества рекомбинантных антител для исследований *in vivo*. Если необходимый для клинических исследований уровень антител IgG человека обычно достигается в стандартно разработанных экспрессионных системах клеток млекопитающих, в которых добиваются посттрансляционных модификаций и типов гликозирования, свойственных антителам человека, то для IgA отсутствует единый подход к конструированию системы их экспрессии. В связи с этим большое практическое значение приобретает оптимизация стандартных методов продукции IgA. К сожалению, большинство предыдущих работ по изучению влияния конструкций векторов на экспрессию в клетках млекопитающих было проведено для IgG. Так, одним из аспектов исследования было изучение регулируемой экспрессии тяжёлой и лёгкой цепей IgG. Трансфекция эукариотических клеток двумя независимыми плазмидами, содержащими одну из цепей, выявила выраженную зависимость экспрессии от сайта интеграции [8], что влияло на соотношение тяжёлой и лёгкой цепей при экспрессии. Известно, что для стабильной экспрессии в клетках СНО экспрессионный вектор должен обеспечивать соотношение “тяжёлая цепь : лёгкая цепь” менее чем 1:2, что делает возможным получение большой фракции клеточных клонов с высоким уровнем экспрессии моноклональных антител [9]. Более эффективным для продукции IgG в клетках млекопитающих оказался вектор, содержащий бицистронную конструкцию [10, 11]. Был изучен уровень продукции рекомбинантного IgG при различном дизайне экспрессионных векторов при транзientной и стабильной экспрессии в клетках НЕК-293Т, СНО-K1(13) и СНО-DG44 [12–15].

Одним из преимуществ использования антител IgA в качестве терапевтического средства против гриппа является их мукозальное применение. Ранее было выделено моноклональное антитело F16, узнающее гемагглютинин всех 16 серотипов и нейтрализующее группы 1 и 2 вируса гриппа А [16].

Получение терапевтических средств на основе IgA-антител требует разработки стабильных высокопродуктивных клеточных линий. В связи с этим получение новых оптимизированных конструкций экспрессионных векторов и исследование их влияния на продуктивность рекомбинантных IgA-антител имеют важное значение. Цель настоящей работы заключалась в усовершенствовании эукариотического вектора для повышения уровня экспрессии IgA на основе вариабельных доменов антитела F16 к гемагглютинину вируса гриппа А в клетках млекопитающих. В задачи исследования также входило выяснение влияния наличия интронов в области константного домена тяжёлой цепи на уровень продукции рекомбинантных антител при трансфекции эукариотических клеток соответствующим вектором.

Материалы и методы

Создание экспрессионных плазмид для продукции рекомбинантных антител в клетках млекопитающих. Для получения гена лёгкой цепи антитела F16v3 [16] с секреторным пептидом антитела F10 [17] с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) на матрице плазмиды pOpti-F10L-MluI [18] получали фрагменты, содержащие последовательности секреторного пептида F10L и константного домена легкой каппа-цепи [17–19]. Аналогично на матрице ранее сконструированной плазмиды pTrc99A-stIIIF16LH [20] получали фрагмент, содержащий последовательность вариабельного домена антитела F16v3. Последовательности объединяли с помощью метода ПЦР с использованием коротких перекрывающихся последовательностей (SOE-PCR), результирующий фрагмент обрабатывали рестриктазами NheI и XhoI и клонировали по данным сайтам в экспрессионный вектор pOpti-F10L-MluI [18], полученный на основе pOptiVEC™-ТОР0® (Invitrogen).

Для получения гена вариабельной области тяжёлой цепи F16v3 с секреторным пептидом F10H на матрице плазмид pTrc99A-stIIIF16LH [20] и pcDNA3.3-H [18] получали фрагменты, содержащие кодирующие последовательности вариабельного домена тяжёлой цепи F16v3 и секреторного пептида F10H [17], соответственно, после чего состыковали последовательности с помощью метода ПЦР с удлинённым перекрытием (SOE-PCR). Полученный фрагмент обрабатывали рестриктазами NheI и Bsp120I, клонировали в плазмиду pcDNA3.3-H [18] и секвенировали, получая таким образом плазмиду pcDNA3.3-F16HG1.

На матрице геномной ДНК человека с помощью ПЦР получали фрагменты, содержащие отдельные экзоны IgA1, которые клонировали в pAL-TA (Евроген, Россия), и секвенировали. Для получения кодирующей последовательности изотипа IgA1 с помощью ПЦР на матрице полученных клонов отдельно синтезировали последовательности каж-

дого из трёх экзонов IgA1. Полученные фрагменты объединяли с помощью метода ПЦР с удлинённым перекрытием. Одновременно удаляли сайт рестрикции XhoI во втором экзоне гена с помощью сайт-направленного мутагенеза. Результирующий фрагмент обрабатывали рестриктазами SacI и XhoI. Затем полученный фрагмент совместно с фрагментом NheI-Bsp120I из плазмиды pcDNA3.3-FI6HG1 клонировали по сайтам узнавания рестриктаз NheI и XhoI в промежуточный вектор pSK+/hEF1-HTLV-BGH [18], содержащий гибридный промотор hEF1-HTLV и сайт полиаденилирования BGH, получая плазмиду pSK-EF1-FI6HA1-BGH. Фрагмент MluI-MluI из плазмиды pSK-EF1-FI6HA1-BGH, содержащий ген тяжёлой цепи антитела FI6 изотипа IgA1 с секреторным пептидом F10, был поставлен под контроль промотора hEF1-HTLV и содержал сайт полиаденилирования BGH. В результате данного клонирования были получены две разные конструкции, отличающиеся по типу ориентаций – с однонаправленной (pBiPr-ABiGAI1F16-ht,) и разнонаправленной (pBiPr-ABiGAI1F16-hh) транскрипцией генов тяжёлой и лёгкой цепей антитела. Далее в тексте однонаправленная ориентация промоторов (ht) обозначается как “голова-хвост”, а разнонаправленная (hh) – “голова-голова”. Схематическое изображение плазмид приведено на рис. 1 А, Б.

Кодирующую последовательность константных доменов гена IgA, состоящую из экзонов, разделённых двумя интронами, получали в два этапа. На первом этапе, используя геномную ДНК человека в качестве матрицы, получали два фрагмента с помощью ПЦР с праймерами для удаления сайта рестрикции XhoI во втором экзоне IgA1 и праймерами, ограничивающими нуклеотидную последовательность константных доменов IgA1, которые клонировали в pAL-TA (Евроген, Россия) и секвенировали. На втором этапе на матрице клонов с помощью ПЦР с теми же праймерами получали два фрагмента с одновременным удалением сайта рестрикции XhoI во втором экзоне гена, фрагменты объединяли с использованием метода ПЦР с удлинённым перекрытием. Клонирование проводили аналогично схеме для кодирующей последовательности IgA1 без интронов (см. выше). В результате также было получено две разные конструкции, отличающиеся по типу ориентации – с однонаправленной (pBiPr-ABiGAI1F16-Iht) и разнонаправленной (pBiPr-ABiGAI1F16-Ihh) транскрипцией генов тяжёлой и лёгкой це-

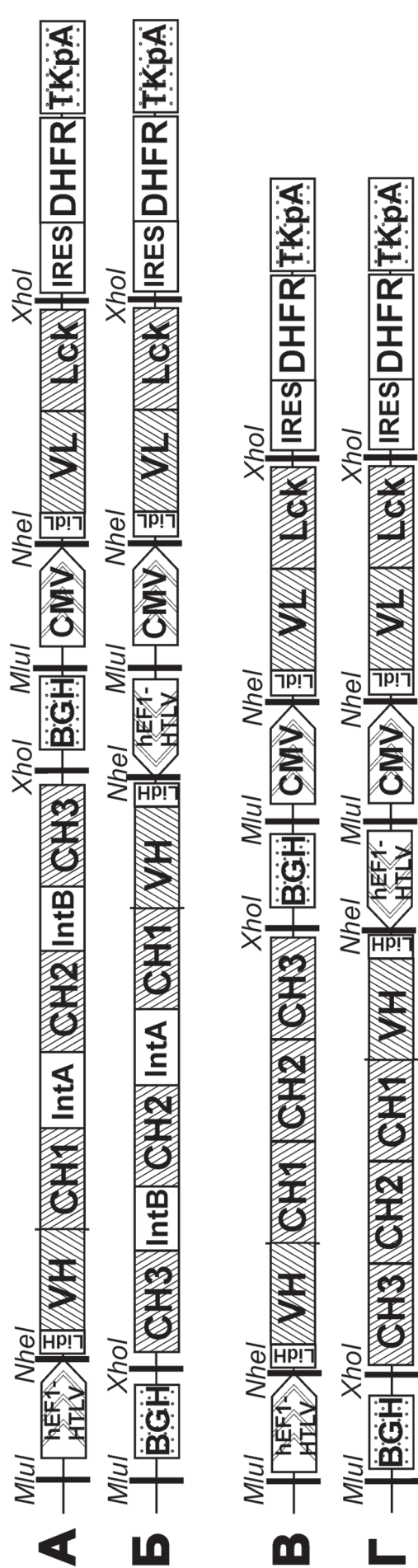


Рис. 1. Структура экспрессионных плазмид IgA1. А - плазида pBiPr-ABiGAI1F16-ht; Б - плазида pBiPr-ABiGAI1F16-hh; Г - плазида pBiPr-ABiGAI1F16-Iht. Основные обозначения: P_{CMV} – промотор/энхансер ранних генов цитомегаловируса человека; IRES – внутренний сайт связывания рибосом вируса энцефаломиокарита (EMCV); DHFR – ген дигидрофолатредуктазы; TK pA – сигнал полиаденилирования тимидинкиназы вируса герпеса; lck – кодирующая последовательность секреторного пептида легкой цепи антитела F10; VL – кодирующая последовательность вариабельного домена легкой цепи антитела F16 к гематоглину вируса гриппа А; Lck – кодирующая последовательность константного домена каппа легкой цепи антитела человека; VH – кодирующая последовательность вариабельного домена тяжелой цепи антитела F16 к гематоглину вируса гриппа А; lck – кодирующая последовательность секреторного пептида тяжелой цепи антитела F10; HC – кодирующая последовательность константных доменов IgA1; IntA, IntB – интроны гена IgA1; hEF1-HTLV – гибридный промотор, состоящий из промотора фактора элонгации EF-1a и 5'-нетранслируемой области вируса Т-клеточной лейкемии человека (HTLV); BGH pA – сайт полиаденилирования и терминатор гена бычьего гормона роста BGH; MluI, NheI, XhoI – сайты узнавания соответствующих эндонуклеаз рестрикции

пей антитела. Схематическое изображение плазмид приведено на рис. 1 В, Г.

Получение препаратов плазмидной ДНК для трансфекции. Плазмидную ДНК нарабатывали в клетках *E. coli* штамма Nova Blue (DE3) (Novagen, США) и выделяли с помощью набора “Plasmid Miniprep” (Евроген, Россия). Концентрацию полученной плазмиды определяли спектрофотометрически по поглощению при длине волны 260 нм на приборе “Implen NanoPhotometer® P200” (Implen GmbH, Германия). Чистоту и линейность плазмиды определяли с помощью электрофореза в 0,6%-ном агарозном геле (рис. 2). Плазмидную ДНК линеаризовали с помощью рестриктазы PstI (НПО “СибЭнзим”, Россия).

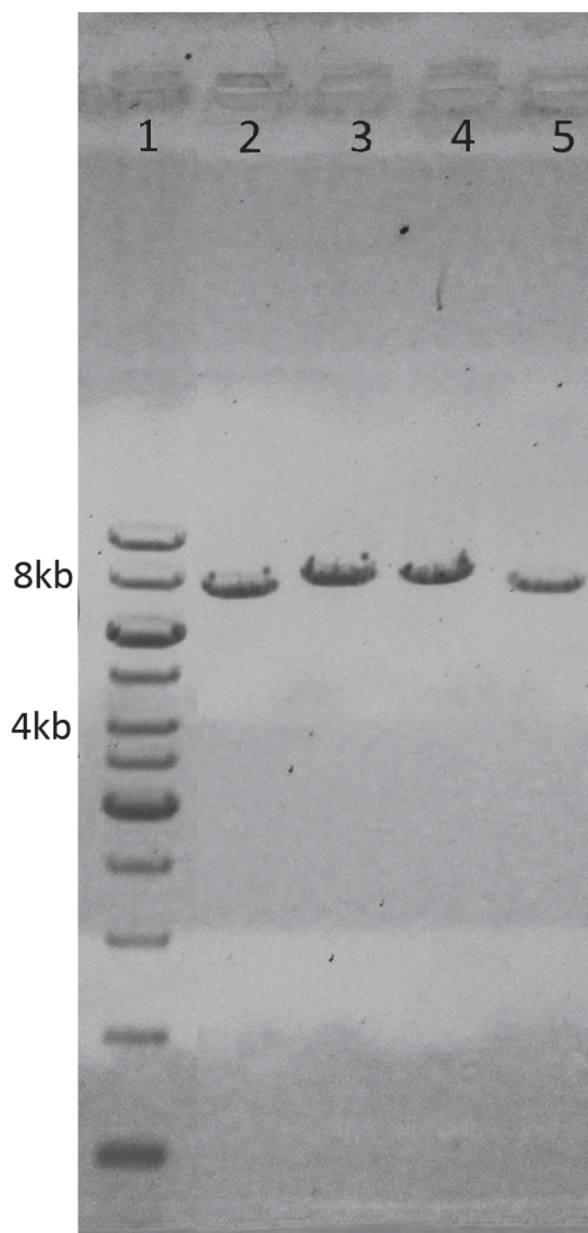


Рис. 2. Электрофореграмма линеаризованных экспрессионных плазмид. 1 — маркер молекулярных масс (O'GeneRuler 1kb DNA ladder Fermentas, 250 bp — 10kb), 2 — плаزمида pBiPr-ABlgA1FI6-hh, 3 — плазмида pBiPr-ABlgA1FI6-Iht, 4 — плазмида pBiPr-ABlgA1FI6-Ihh, 5 — плазмида pBiPr-ABlgA1FI6-ht

Трансфекция. Клетки CHO-DG44 (dhfr-) (Thermo Fisher Scientific, США) выращивали с использованием стандартной среды IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco, США) с использованием 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HI FBS, Gibco, США), а клетки HEK-293T — на среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, США) с использованием 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HI FBS, Gibco, США) в CO₂-инкубаторе при 96%-ной влажности, 37°C и 8% CO₂.

Для стабильной трансфекции исходные клетки, достигшие ≥90% сомкнутого монослоя, высевали в количестве 400 000 клеток/лунку. Измерение концентрации клеток и их жизнеспособности проводилось с использованием 0,04%-ного раствора трипанового синего (Gibco, США) в камере Горяева. Клетки выращивали в 6-луночных планшетах (Greiner Bio-One, Германия) по достижению ими 80–90% сомкнутого монослоя. Трансфекцию исходных клеток проводили с применением трансфицирующего реагента Lipofectamine-3000 Transfection Kit (Invitrogen, США) по стандартному протоколу, представленному производителем. Клетки, в которые добавляли реагент Lipofectamine-3000 при отсутствии плазмидной ДНК, являлись отрицательным контролем на каждом планшете. Трансфекция проводилась четырьмя вариантами плазмид: pBiPr-ABlgA1FI6-hh, pBiPr-ABlgA1FI6-Iht, pBiPr-ABlgA1FI6-Ihh, pBiPr-ABlgA1FI6-ht (рис. 1).

После проведения трансфекции клетки инкубировали в течение 72 ч. Во временные интервалы 24, 48 и 72 ч (для определения наиболее эффективного времени после трансфекции) были взяты пробы для иммуоферментного анализа (ИФА).

Иммуоферментный анализ. Экспрессию IgA определяли методом непрямого ИФА. На 96-луночные планшеты в качестве антигена наносились моноклональные антитела мыши к каппа-домену лёгкой цепи иммуноглобулинов человека (Биалекса, Россия) в количестве 0,5 мкг/лунку. При проведении анализа использовали Anti-Human IgA (α-chain specific) (Sigma, США), конъюгированные с пероксидазой хрена. В качестве стандарта использовали IgA из сыворотки человека (Sigma, США).

Результаты и обсуждение

Для экспрессии рекомбинантного IgA были сконструированы экспрессионные бипромоторные плазмиды: pBiPr-ABlgA1FI6-hh, pBiPr-ABlgA1FI6-Iht, pBiPr-ABlgA1FI6-Ihh, pBiPr-ABlgA1FI6-ht. В ходе конструирования ген лёгкой цепи был поставлен под контроль промотора CMV и сигнала полиаденилирования ТКрА, ген тяжёлой цепи — под контроль рекомбинантного промотора HEF1-HTLV и сигнала полиаденилирования ВГН. Присутствие лидерных пептидов на N-концевых частях лёгкой и тяжёлой цепей позволяло осуществлять секрецию иммуноглобулина непосредственно в культу-

ральную среду. В ходе клонирования тяжёлой цепи в экспрессионный вектор по сайту MluI были получены два типа ориентации (рис. 1): с однонаправленной (ht) и разнонаправленной (hh) транскрипцией. Для осуществления селекции трансфицированных клеток в средах без гипоксантина и тимидина экспрессионный вектор содержал ген дигидрофолат-редуктазы (ДГФР). Данный ген располагался на мРНК лёгкой цепи на расстоянии 650 п.н. от гена лёгкой цепи по ходу транскрипции. Трансляция гена ДГФР обеспечивалась с помощью IRES-элемента, который располагался против хода транскрипции гена ДГФР.

Наряду с влиянием ориентации промоторов было также изучено влияние интронов в константном домене IgA на экспрессию антител. Для сравнения полученных плазмидных конструкций были использованы два вида эукариотических клеток: CHO-DG44 — как наиболее часто используемые при получении терапевтических антител, а также клетки человека линии HEK-293T. Использование HEK-293T было обусловлено тем, что процесс гликозирования в клетках человека отличен от такового в клетках китайского хомячка. Так, было показано, что клетки CHO продуцируют гликан преимущественно трёхветвистой структуры, тогда как сывороточный IgA человека обладает в основном двухветвистой структурой, что приводит к разнице в продуцировании IgA [15].

Результаты ИФА для проб, отобранных через 24, 48 и 72 ч (рис. 3), показали преимущество экспрессии в клетках HEK-293T по сравнению с экспрессией в CHO-DG44 в случае трансфекции серией плазмид, не содержащих интроны в константных регионах IgA1. При этом, если при трансфекции плазмидой с ориентацией направления транскрипции “голова-голова” разница между двумя типами клеток была незначительна, для ориентации “голова-хвост” уровень экспрессии в клетках HEK-293T оказался в 2 раза большим, чем в клетках CHO-DG44. Однако наилучший уровень экспрессии антител был получен при трансфекции плазмидой с ориентацией направления транскрипции “голова-хвост” как для CHO-DG44, так и для HEK-293T. Результаты по экспрессии антител, полученные при трансфекции плазмидами, содержащими интроны в области константных доменов IgA1, также продемонстрировали, что максимальный уровень достигается для варианта “голова-хвост” при экспрес-

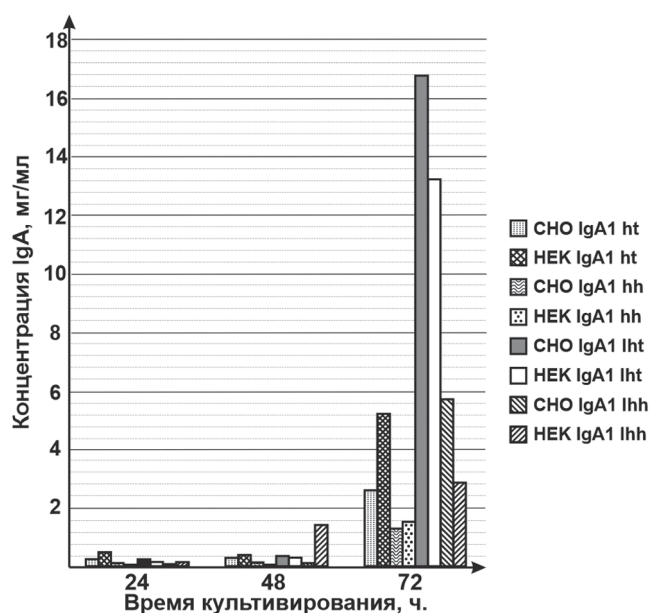


Рис. 3. Концентрация антител IgA1 в культуральной среде после трансфекции клеток CHO-DG44 и HEK-293T различными конструкциями плазмид через 24, 48 и 72 ч. Определение концентрации антител IgA1 в культуральной среде осуществляли методом ИФА

сии в обеих клеточных линиях. При этом, если уровень экспрессии антител при трансфекции плазмидой с разнонаправленной ориентацией в клетках китайского хомячка составил 5,5 мг/л, то для варианта с однонаправленной транскрипцией — 17 мг/л. Таким образом, уровень экспрессии антител во втором случае был выше в 3 раза.

Результаты экспериментов показали, что для обоих типов клеток наблюдаются одинаковые закономерности влияния направления промоторов и наличия интронов на уровень биосинтеза антител изотипа IgA1. При этом максимальные результаты продемонстрировал вариант трансфекции экспрессионной плазмидой, содержащей интроны и однонаправленную ориентацию транскрипции.

Работа выполнена при финансовой поддержке субсидии (Соглашение № 14.607.21.0060), выделяемой Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках реализации федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы” (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0060).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beyer T., Lohse S., Berger S., Peipp M., Valerius T., Dechant M. Serum-free production and purification of chimeric IgA antibodies // *J. Immunol. Methods*. 2009. Vol. 346. N 1–2. P. 26–37.
2. Woof J.M., Kerr M.A. The function of immunoglobulin A in immunity // *J. Pathol.* 2006. Vol. 208. N 2. P. 270–282.
3. Woof J.M., Russell M.W. Structure and function relationships in IgA // *Mucosal Immunol.* 2011. Vol. 4. N 6. P. 590–597.

4. Lohse S., Derer S., Beyer T., Klauz K., Peipp M., Leusen J.H.W., Van de Winkel J.G.J., Dechant M., Valerius T. Recombinant dimeric IgA epidermal growth factor receptor mediate effective tumor cell killing // *J. Immunol.* 2011. Vol. 18. N 6. P.3770–3778.

5. Muramatsu M., Yoshida R., Miamoto H., Tomabechi D., Masahiro K. Heterosubtypic antiviral activity of hemagglutinin-specific antibodies induced by intranasal immunization

with inactivated influenza viruses in mice // PLoS One. 2013. Vol. 8. N 8. e71534.

6. Van Riet E., Ainal A., Suzuki T., Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design // Vaccine. 2012. Vol. 30. N 40. P. 5893–5959.

7. Blutt S.E., Miller A.D., Salmon L., Metzger D.W., Conner M.E. IgA is important for clearance and critical for protection from rotavirus infection // Mucosal Immunol. 2012. Vol. 5. N 6. P. 712–719.

8. Corti D., Voss J., Gamblin S. J., et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binding to group1 and group2 influenza A hemagglutinin // Science. 2011. Vol. 33. N 6044. P. 850–856.

9. Wurm F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells // Nat. Biotechnol. 2004. Vol. 22. N 11. P. 1393–1398.

10. Schlatter S., Stansfield S.H., Dinnis D.M., Racher A.J., Birch J.R., James D.C. On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells // Biotechnol. Prog. 2005. Vol. 21. N 1. P. 122–133.

11. Jostock T., Vanhove M., Brepoels E., van Gool R., Daukandt M., Wehnert A., van Hegelsom R., Dransfield D., Sexton D., Devlin M., Ley A., Hoogenboom H.R., Müllberg J. Rapid generation of functional human IgG antibodies derived from Fab on-phage display libraries // J. Immunol. Methods. 2004. Vol. 289. N 1–2. P. 65–80.

12. Li J., Menzel C., Meier D., Zhang C., Dübel S., Jostock T. A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies // J. Immunol. Methods. 2007. Vol. 318. N 1–2. P. 113–124.

13. Chusainow J., Yang Y.S., Yeo J.H.M., Toh P.C., Asvadi P., Wong N.S., Yap M.G. A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: What makes a stable high producer? // Biotechnol. Bioeng. 2009. Vol. 102. N 4. P. 1182–1194.

14. Van Craenenbroeck K., Vanhoenacker P., Haegeman G. Episomal vectors for gene expression in mammalian cells // Eur. J. Biochem. 2000. Vol. 267. N 18. P. 5665–5678.

15. Bout A., Halford D., Jones A. Efficient production of IgA in recombinant mammalian cells. Patent EP1508576A1, 2005.

16. Corti D., Voss J., Gamblin S.J., et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binding to group1 and group2 influenza A hemagglutinin // Science. 2011. Vol. 333. N 6044. P. 850–856.

17. Radko B.V., Boitchenko V.E., Nedospasov S.A., Korobko V.G. Characterization of the genes encoding variable light and heavy chains of the high-affinity monoclonal antibody against human tumor necrosis factor // Russ. J. Immunol. 2002. Vol. 7. N 4. P. 371–374.

18. Алиев Т.К., Балабашин Д.С., Долгих Д.А., Кирпичников М.П., Панина А.А., Топорова В.А. Рекомбинантная плазмидная ДНК, кодирующая химерное антитело против фактора некроза опухоли-альфа человека, линия эукариотических клеток — продуцент химерного антитела и способ получения химерного антитела. Патент № 2555533, Россия, 23.05.2013.

19. Balabashin D., Kovalenko E., Toporova V., Aliev T., Panina A., Svirshchevskaya E., Dolgikh D., Kirpichnikov M. Production of anti tnf- α antibodies in eukaryotic cells using different combinations of vectors carrying heavy and light chains // Cytotechnology. 2015. Vol. 67. N 5. P. 761–772.

20. Aliev T.K., Dement'yeva I.G., Bokov M.N., Pozdnyakova L.P., Sveshnikov P.G., Toporova V.A., Rybchenko V.S., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. Development and properties of recombinant proteins based on the broadly neutralizing antibody to influenza A virus // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2016. Vol. 71. N 2. P. 87–92.

Поступила в редакцию
12.12.2016

Принята к печати
02.03.2017

MOLECULAR BIOLOGY

STUDIES OF THE INFLUENCE OF DIFFERENT EUKARYOTIC VECTORS' DESIGN ON THE EXPRESSION OF RECOMBINANT ANTIBODY IgA1 ISOTYPE

V.V. Argentova^{1,*}, T.K. Aliev³, V.A. Toporova⁴, V.S. Rybchenko², D.A. Dolgikh⁴, M.P. Kirpichnikov¹

¹Department of Bioengineering and ²Department of Biochemistry, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia;

³Department of Chemical Enzymology, School of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–3, Moscow, 119234, Russia;

⁴Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya ul. 16/10, GSP-7, Moscow, 117997, Russia

*e-mail: vicarg@rambler.ru

Production and application of therapeutic monoclonal antibodies take second place in the global pharmaceutical market after vaccines. Nowadays the IgG1 is one of the prevailing monoclonal antibodies type for the therapeutic use that are produced in CHO cells. Recently the possibility of developing therapeutic drugs based on antibodies of IgA-isotype has demonstrated a broad range of effector functions on human mucous membranes, which has caused a significant interest in this research field. In our research about level of IgA1 antibody expression in mammalian cells, we designed a set of bipromoter (CMV, EF1 α) vectors containing variable regions of heavy chain (VH) and light chain (VL) genes from human monoclonal antibody FI6v3 against influenza A virus, constant regions IgA1 of heavy and light chains of human antibody (with or without introns). The vectors differed in mutual orientation of promoters and presence or lack of introns. Two versions of the full-length light and heavy chains were cloned in eukaryotic expressing vector in “head-head”/ “head-tail” orientations and then transfected into HEK-293T and CHO/dhfr-

cells. The level of antibody production was determined using ELISA test for transfection of CHO DG44 and HEK-293T cell culture. The results of the experiments showed a significant increase in the production of FI6v3-IgA1 antibodies when eukaryotic cells were transfected with a plasmid pBiPr-ABiGAI6-Iht containing introns in constant regions of IgA1 and with orientation of transcription in the “head-tail” direction.

Key words: *Bi-promoter vector, influenza A virus, introns, promoters of different orientation, eukaryotic expression, monoclonal antibody IgA1*

Сведения об авторах

Аргентова Виктория Витальевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: vicarg@rambler.ru

Алиев Теймур Кантамирович — науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ. Тел.: 8-495-330-66-38; e-mail: ta12345@list.ru

Топорова Виктория Александровна — мл. науч. сотр. Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Тел.: 8-495-330-66-38; e-mail: rhuta@rambler.ru

Рыбченко Владислав Сергеевич — студент биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-330-66-38; e-mail: vladislavrusia@yandex.ru

Долгих Дмитрий Александрович — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-336-80-11; e-mail: dolgikh@nmr.ru

Кирпичников Михаил Петрович — академик РАН, проф., докт. биол. наук, зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru