

УДК 602.6

## УВЕЛИЧЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ГЛИКОПРОТЕИНОВЫХ ГОРМОНОВ ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ СНО ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ БЕТА-ЦЕПЕЙ

© 2024 г. М. В. Синегубова\*, Д. Э. Колесов, Л. К. Даянова,  
И. И. Воробьев, Н. А. Орлова

Представлено академиком РАН В.О. Поповым

Поступило 09.10.2023 г.

После доработки 13.10.2023 г.

Принято к публикации 13.10.2023 г.

Исследовано влияние гетерологичных сигнальных пептидов у  $\beta$ -цепей гликопротеиновых гормонов на биосинтез данных гормонов в транзистентно трансфицированной культуре клеток яичника китайского хомячка СНО S. При замене природных сигнальных пептидов  $\beta$ -цепей на гетерологичный сигнальный пептид человеческого сывороточного альбумина продуктивность клеток была увеличена в 2–2.5 раза для лютеинизирующего гормона человека, хорионического гонадотропина человека, тиреотропного гормона человека, но не фолликулостимулирующего гормона человека. Для сигнального пептида азуроцидина человека и сигнального пептида  $\alpha$ -цепи гликопротеиновых гормонов человека не наблюдалось достоверного увеличения продуктивности клеток. Использованный подход позволяет быстро оценивать влияние гетерологичных сигнальных пептидов на биосинтез гетеродимерных белков различных классов.

*Ключевые слова:* гликопротеиновые гормоны, сигнальные пептиды, клетки яичника китайского хомячка, транзистентная экспрессия

DOI: 10.31857/S2686738924010067, EDN: KUZBCS

Семейство гликопротеиновых гормонов млекопитающих включает в себя несколько аденогипофизарных гормонов, в том числе тиреотропный гормон (ТТГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ), используемых в медицинских целях, а также хорионический гонадотропин человека (ХГч), вырабатываемый преимущественно плацентой. Все гликопротеиновые гормоны состоят из двух гликозилированных субъединиц –  $\alpha$  (общей для всего семейства) и  $\beta$  (специфической) – и оказывают свое физиологическое действие только в виде гетеродимера.

Превращение пре- $\alpha$  и пре- $\beta$ -субъединиц, содержащих сигнальные последовательности, в их зрелые формы включает два события: отщепление сигнального пептида (происходит котрансляционно [1]) и гликозилирование (происходит как ко-, так

и посттрансляционно [2]). Свертывание и сборка субъединиц гормона происходят в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Для ЛГ было прямо продемонстрировано, что сворачивание  $\beta$ -субъединицы требует обязательного присутствия в эндоплазматическом ретикулуме  $\alpha$ -субъединицы, которая действует как шаперон [3]. Весьма вероятно, что все гликопротеиновые гормоны *in vivo* проходят через фолдинг  $\beta$ -цепей в комплексе с  $\alpha$ -цепью, однако доказать это утверждение строгим образом для других гормонов не представляется возможным, поскольку *in vitro*  $\beta$ -цепи могут фолдироваться и секретироваться клетками независимо от  $\alpha$ -цепи [4].

Поскольку в современной клинической практике все гликопротеиновые гормоны используются в рекомбинантной форме, повышение удельной продуктивности секретирующих их клеток, в первую очередь клеток яичника китайского хомячка СНО, остается актуальной задачей. Одной из известных лимитирующих стадий классического пути секреции белков является ко-трансляционная транслокация синтезируемых полипептидов в ЭР. Показано, что различные сигнальные последовательности могут увеличивать скорость прохождения

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

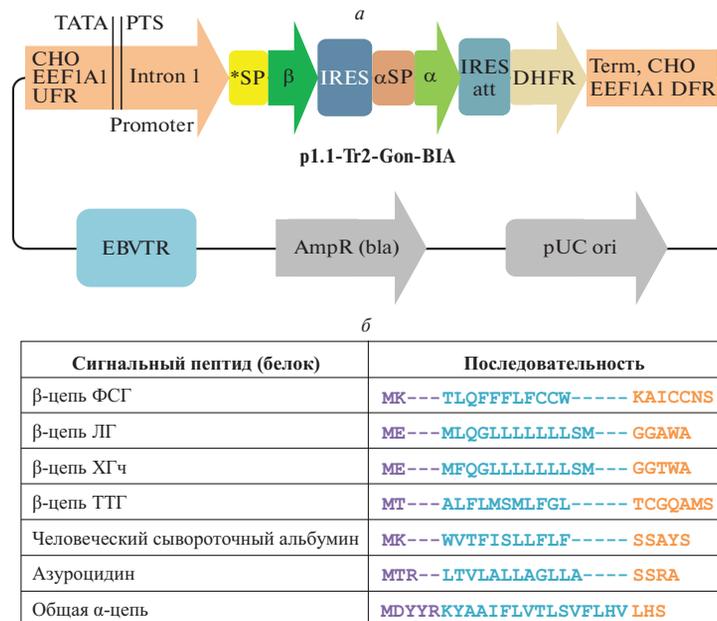
\*E-mail: mvsineg@gmail.com

этой стадии, что приводит, в свою очередь, к увеличению секреции белка [5]. По-видимому, для белков разных классов не существует универсально эффективного сигнального пептида [6]. Более того, для клеток CHO было показано, что нативный сигнальный пептид не обязательно наиболее эффективен [5, 7, 8]. В частности, Кобер (Kober) и соавторы продемонстрировали увеличение уровня секреции клетками CHO модельных белков (антитела и Fc-слитого белка) с гетерологичными сигнальными последовательностями – препро-белка человеческого сывороточного альбумина и препро-белка азуроцидина [9]. Также активно ведутся исследования неприродных (синтетических) сигнальных пептидов для увеличения уровня экспрессии рекомбинантных белков [10, 11]. Замена нативных сигнальных пептидов на гетерологичные позволила увеличить титр рекомбинантных антител [12], однако для гликопротеиновых гормонов данный вопрос остается совершенно неисследованным.

Ранее нами было обнаружено, что при экспрессии генов субъединиц ФСГ в клетках CHO в составе

трицистронной плазмиды клетки преимущественно секретируют свободную  $\alpha$ -субъединицу, а не гетеродимерный гормон [4]. Накопление в культуральной среде больших количеств свободной  $\alpha$ -субъединицы было прекращено путем повторной трансфекции клеток плазмидой, кодирующей ген  $\beta$ -субъединицы ФСГ и дополнительный селекционный маркер [4].

Такой способ балансировки уровней биосинтеза субъединиц гормонов требует очень большого времени на получение линий-продуцентов и, по-видимому, не позволяет отбирать наиболее продуктивные клоны клеток из-за независимого распределения уровней экспрессии генов субъединиц гормонов в разных индивидуальных клетках. Мы предположили, что скорости биосинтеза  $\beta$ -субъединиц гликопротеиновых гормонов могут быть понижены их природными неоптимальными сигнальными пептидами, в таком случае замена этих пептидов на более эффективные может привести к повышению уровня биосинтеза гетеродимерных гормонов.

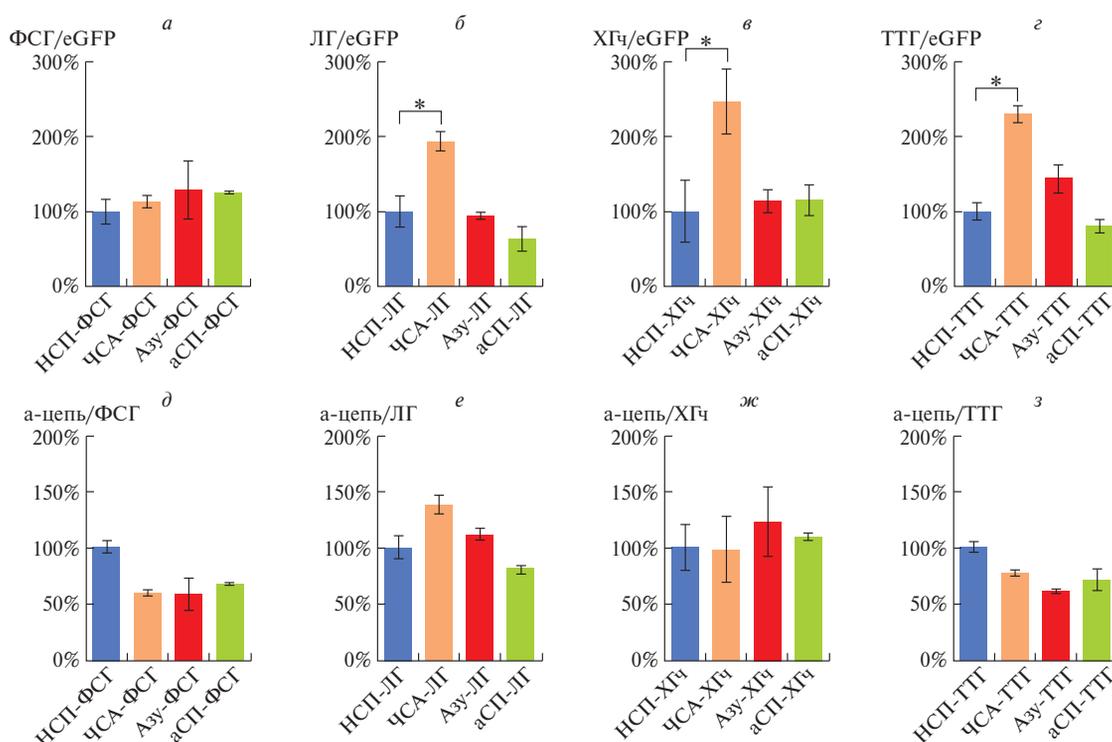


**Рис. 1.** Карта трицистронных экспрессионных плазмид, кодирующих цепи гликопротеиновых гормонов, и последовательности сигнальных пептидов. (а) Карта плазмид, обозначения: pUC origin – область начала репликации плазмиды pUC; bla – открытая рамка считывания бета-лактамазы; EBVTR – участок терминального повтора вируса Эпштейн-Барр человека; CHO EEF1A1 UFR и CHO EEF1A1 DFR – районы, фланкирующие ген EEF1A1 китайского хомячка, содержат промотор, интрон, терминатор и сигнал полиаденилирования гена EEF1A1; TATA – TATA-бокс; PTS – предполагаемая точка начала транскрипции; IRES – природный внутренний сайт связывания рибосом EMCV дикого типа; IRES att – аттенюированный внутренний сайт связывания рибосом; \*SP – варьируемый сигнальный пептид  $\beta$ -цепи;  $\beta$  – ОПС  $\beta$ -цепи соответствующего гормона;  $\alpha$ SP – сигнальный пептид  $\alpha$ -цепи гликопротеиновых гормонов;  $\alpha$  – ОПС  $\alpha$ -цепи; DHFR – ОПС дигидрофолатредуктазы мыши. (а) Последовательности сигнальных пептидов, фиолетовым шрифтом выделена N-область по данным алгоритма SignalP 6.0, голубым шрифтом – Н-область, оранжевым – С-область.

Для выявления более эффективных сигнальных пептидов  $\beta$ -субъединиц гормонов были использованы плазмиды p1.1-Tr2-Gon BIA на основе ранее разработанной нами векторной плазмиды p1.1-Tr2 [13,14], кодирующие  $\beta$ -субъединицы гормонов в первом цистроне трицистронной матрицы, одинаковую для всех случаев  $\alpha$ -субъединицу гормонов во втором цистроне и селекционный маркер дигидрофолатредуктазу (DHFR) в третьем цистроне, т.е. схему  $\beta$ -цепь-IRES- $\alpha$ -цепь-IRESatt-DHFR (рис. 1). Для каждой  $\beta$ -цепи кодировали четыре разных сигнальных пептида: нативный сигнальный пептид  $\beta$ -цепи соответствующего гормона (НСП), а также гетерологичные для  $\beta$ -цепи сигнальные пептиды – азурицидин (Азу), человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), общей для гликопротеиновых гормонов  $\alpha$ -цепи (аСП).

Получение кодирующих последовательностей с природными сигнальным пептидами для ФСГ человека описано в [4], для ЛГ – в [15], в слу-

чае ХГЧ и ТТГ использовали синтетические гены  $\beta$ -цепей, полученные при обратной трансляции последовательностей NP\_000728 и NP\_000540.2 соответственно. Синтетические последовательности « $\beta$ -цепь-IRES- $\alpha$ -цепь» клонировали в экспрессионные векторы по сайтам рестрикции *AbsI-NheI*. Для замены сигнальных пептидов  $\beta$ -цепей проводили step-out ПЦР, используя пары длинных адапторных праймеров, в которых закодирован сигнальный пептид и синтетическая последовательность Козак, и общий для каждой  $\beta$ -цепи обратный праймер. Продукты ПЦР субклонировали в Т-вектор, секвенировали и переносили в экспрессионные плазмиды по сайтам *AbsI-SpeI/NheI*, заменяя нативную  $\beta$ -цепь. Вероятность корректного процессинга всех выбранных сигнальных пептидов в комбинации с соответствующими субъединицами, рассчитанная при помощи биоинформатического сервиса SignalP 6.0 [16], составила более 95% во всех случаях; таким образом, для всех 16 плазмид



**Рис. 2.** Титр гликопротеиновых гормонов, секретируемых транзитивно трансфицированной культурой клеток СНО, при варьировании сигнальных пептидов их  $\beta$ -цепей. (а – г) Концентрация гетеродимерной формы гормонов (по данным ИФА), нормализованная на уровень зеленого флуоресцентного белка eGFP в лизате клеток. (д – з) Титр секретируемой  $\alpha$ -цепи с нативным сигнальным пептидом (оценка методом ИФА), нормализованный на титр гетеродимерной формы гормона. Представлен средний результат трех независимых биологических повторов, два повтора в ИФА для каждого образца, значения для контрольного пептида НСП приняты за 100%, \* –  $p < 0,05$ , однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки. Сокращения: ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; ЛГ – лютеинизирующий гормон; ХГЧ – хорионический гонадотропин человека; ТТГ – тиреотропный гормон; НСП – нативный сигнальный пептид  $\beta$ -цепи соответствующего гормона; ЧСА – человеческий сывороточный альбумин; Азу – азурицидин; аСП – сигнальный пептид  $\alpha$ -цепи гликопротеиновых гормонов.

ожидалось получение гетеродимерных гормонов в культуральной среде после трансфекции клеток CHO. Полученные плазмиды смешивали в фосфатно-солевом буфере в соотношении 95:5 с контрольной плазмидой, кодирующей зеленый флуоресцентный белок eGFP (pEGFP-N2, Clontech, США, Addgene #6081–1), и трансфицировали при помощи липосомального реагента GenJect39 (Molecula, Россия) в клетки CHO S, трансфекцию вели в трех биологических повторностях. Через 3 дня после трансфекции в культуральной среде методом ИФА измеряли концентрации гетеродимерных гормонов (использованные антитела: конъюгат моноклональных антител против  $\alpha$ -субъединицы гликопротеиновых гормонов с пероксидазой хрена #XF1\*, моноклональные антитела против  $\beta$ -субъединицы ЛГ #XL1, моноклональные антитела против  $\beta$ -субъединицы ФСГ #XF2, моноклональные антитела против  $\beta$ -субъединицы ТТГ #ХТВ1, моноклональные антитела против  $\beta$ -субъединицы ХГЧ #ХН51, все производства ООО ХЕМА, Россия) и суммарные концентрации  $\alpha$ -субъединиц (использованные антитела: конъюгат моноклонального антитела против  $\alpha$ -субъединицы гликопротеиновых гормонов с пероксидазой хрена #K003/1\*, моноклональные антитела против  $\alpha$ -субъединицы гликопротеиновых гормонов с пероксидазой хрена #K003, все производства ООО Диатех, Россия). Также собирали клетки, лизировали их и измеряли интенсивности флуоресценции eGFP в лизате для нормализации данных. Для всех конструкций наблюдали секрецию гетеродимерных форм гормонов в культуральную среду (рис. 2).

Для всех гормонов, кроме ФСГ, при замене нативных сигнальных пептидов  $\beta$ -цепей на гетерологичный сигнальный пептид ЧСА наблюдали статистически достоверное увеличение уровня секреции гетеродимерных гормонов в 2–2,5 раза. Одновременно с этим для ФСГ и ТТГ, но не для ЛГ и ХГч, фиксировали падение относительного уровня секреции всех форм  $\alpha$ -субъединицы при замене нативных сигнальных пептидов у  $\beta$ -субъединицы на гетерологичные. Мы предполагаем, что для гормонов ЛГ и ХГч, обладающих высокомолекулярными  $\beta$ -субъединицами, происходит удержание свободной  $\alpha$ -субъединицы в ЭПР до связывания с фолдируемой  $\beta$ -субъединицей, и при увеличении количества  $\beta$ -субъединиц в ЭПР можно наблюдать увеличение уровней секреции гетеродимерных гормонов, но не падение уровней секреции свободных  $\alpha$ -субъединиц.

Использованный нами подход демонстрирует, что для большинства гликопротеиновых гормонов возможно увеличение продуктивности клеток за счет повышения эффективности трансляции и транслокации в ЭПР  $\beta$ -субъединиц гормонов при

помощи соединения их в рамке с гетерологичными сигнальными пептидами, среди которых наиболее значимый подъем продуктивности обеспечивает сигнальный пептид ЧСА. Полученные методом транзientной трансфекции данные могут быть в дальнейшем уточнены для стабильно трансфицированных клеточных популяций при большей удельной продуктивности клеток

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jackson R. C., Blobel G. Post-translational processing of full-length presecretory proteins with canine pancreatic signal peptidase // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1980. V. 343. P. 391–404.
2. Weintraub B. D., Stannard B. S., Linnekin D., Marshall M. Relationship of glycosylation to de novo thyroid-stimulating hormone biosynthesis and secretion by mouse pituitary tumor cells // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. P. 5715–5723.
3. Bernard M. P., Lin W., Kholodovych V., Moyle W. R. Human lutropin (hLH) and choriogonadotropin (CG) are assembled by different pathways: a model of hLH assembly // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. P. 14360–14369.
4. Orlova N. A., Kovnir S. V., Khodak Y. A., Polzikov M. A., Nikitina V. A., Skryabin K. G., Vorobiev I. I. High-level expression of biologically active human follicle stimulating hormone in the Chinese hamster ovary cell line by a pair of tricistronic and monocistronic vectors // *PLoS One.* 2019. V. 14. e0219434.
5. Zhang L., Leng Q., Mixson A. J. Alteration in the IL-2 signal peptide affects secretion of proteins in vitro and in vivo // *J. Gene Med.* 2005. V. 7. P. 354–365.
6. Kapp K., Schrempf S., Lemberg M. K., Dobberstein B. Post-Targeting Functions of Signal Peptides. In: *Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience (2000–2013).*
7. Knappskog S., Ravneberg H., Gjerdrum C., Tröbe C., Stern B., Pryme I. F. The level of synthesis and secretion of *Gaussia princeps* luciferase in transfected CHO cells is heavily dependent on the choice of signal peptide // *J. Biotechnol.* 2007. V. 128. P. 705–715.
8. Tan N. S., Ho B., Ding J. L. Engineering a novel secretion signal for cross-host recombinant protein expression // *Protein Eng. Des. Sel.* 2002. V. 15. P. 337–345.
9. Kober L., Zehe C., Bode J. Optimized signal peptides for the development of high expressing CHO cell lines // *Biotechnol. Bioeng.* 2013. V. 110. P. 1164–1173.
10. Yu X., Conyne M., Lake M. R., Walter K. A., Min J. In silico high throughput mutagenesis and screening of signal peptides to mitigate N-terminal heterogeneity of recombinant monoclonal antibodies // *MAbs.* 2022. V. 14.

11. Park J.H., Lee H.M., Jin E.J., Lee E.J., Kang Y.J., Kim S., Yoo S.S., Lee G.M., Kim Y.G. Development of an in vitro screening system for synthetic signal peptide in mammalian cell-based protein production // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2022. V. 106. P. 3571–3582,
12. Haryadi R., Ho S., Kok Y.J., Pu H.X., Zheng L., Pereira N.A., Li B., Bi X., Goh L.T., Yang Y., et al. Optimization of Heavy Chain and Light Chain Signal Peptides for High Level Expression of Therapeutic Antibodies in CHO Cells // *PLoS One* 2015. V. 10. e0116878.
13. Orlova N.A., Kovnir S.V., Hodak J.A., Vorobiev I.I., Gabibov A.G., Skryabin K.G. Improved elongation factor-1 alpha-based vectors for stable high-level expression of heterologous proteins in Chinese hamster ovary cells // *BMC Biotechnol.* 2014. V. 14. P. 56.
14. Sinegubova M., Orlova N., Vorobiev I. Promoter from Chinese hamster elongation factor-1a gene and Epstein-Barr virus terminal repeats concatemer fragment maintain stable high-level expression of recombinant proteins // *Peer J.* 2023. V. 11. e16287.
15. Orlova N.A., Kovnir S.V., Khodak Y.A., Polzikov M.A., Vorobiev I.I. Recombinant human luteinizing hormone for the treatment of infertility: the generation of producer cell lines // *Obstet. Gynecol. Reprod.* 2017. V. 11. P. 33–42.
16. Teufel F., Almagro Armenteros J.J., Johansen A.R., Gíslason M.H., Pihl S.I., Tsirigos K.D., Winther O., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models // *Nat. Biotechnol.* 2022. V. 40. P. 1023.

## ENHANCING HUMAN GLYCOPROTEIN HORMONES PRODUCTION IN CHO CELLS USING HETEROLOGOUS BETA-CHAIN SIGNAL PEPTIDES

M. V. Sinegubova<sup>#</sup>, D. E. Kolesov, L. K. Dayanova, I. I. Vorobiev, N. A. Orlova

*The Federal State Institution “Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences”, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>E-mail: mvsineg@gmail.com

Presented by Academician of the RAS V.O. Popov

We studied the influence of heterologous signal peptides in the  $\beta$ -chains of glycoprotein hormones on the biosynthesis of these hormones in a transiently transfected culture of Chinese hamster ovary cells CHO S. When replacing the natural signal peptides of the  $\beta$ -chains with the heterologous signal peptide of human serum albumin, cell productivity was increased by 2–2.5 times for human luteinizing hormone, human chorionic gonadotropin, human thyroid-stimulating hormone, but not for human follicle-stimulating hormone. No significant increase in cell productivity was observed for human azurocidin signal peptide and human glycoprotein hormone  $\alpha$ -chain signal peptide. The used approach allows quick assessing the effect of heterologous signal peptides on the biosynthesis of heterodimeric proteins of various classes.

*Keywords:* glycoprotein hormones, signal peptides, Chinese hamster ovary cells, transient expression.