


УДК 604.4

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-279-292>

Научная статья | Scientific article



Оптимизация условий культивирования клона-продуцента, коэкспрессирующего арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент, с целью повышения выхода фермента арилсульфатазы В

С.С. Тимонова , К.А. Смолова, И.А. Кирик, М.С. Пантюшенко, Р.Л. Анисимов, Р.А. Хамитов, А.А. Пискунов, В.Н. Бадэ

АО «ГЕНЕРИУМ», ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

 Тимонова Софья Сергеевна; timonova1993@yandex.ru

Резюме

Синдром Марото–Лами (мукополисахаридоз VI типа) – орфанное генетическое заболевание, вызванное мутациями гена *ARSB*, который кодирует лизосомальный фермент арилсульфатазу В. Актуальность исследования заключается в необходимости разработки отечественного препарата рекомбинантной арилсульфатазы В для лечения пациентов с данным заболеванием в Российской Федерации. Ранее были получены клеточные линии-продуценты, коэкспрессирующие целевой фермент арилсульфатазу В и вспомогательный формилглицин-генерирующий фермент на основе клеточной линии СНО. Однако для дальнейшей разработки препарата рекомбинантной арилсульфатазы В представляется важным повышение выхода фермента. **Цель работы:** увеличение продуктивности клонов-продуцентов за счет оптимизации процесса культивирования и добавления в культуральную среду хлорида кальция и сульфата меди. **Материалы и методы:** использовали суспензионную клеточную линию СНО. Моноклональные клеточные линии получали с использованием систем Cell Metric и Clone Pix FL. Концентрацию арилсульфатазы В в культуральной жидкости определяли методом иммуноферментного анализа. Использовали периодическое культивирование (batch culture) и/или периодическое культивирование с подпиткой (fed-batch culture) в среде с добавлением различных концентраций сульфата меди и хлорида кальция. **Результаты:** продемонстрировано, что одновременное добавление сульфата меди и хлорида кальция в концентрации 300 мкМ при периодическом культивировании клонов-продуцентов, коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент, увеличивает жизнеспособность культур и повышает удельную продуктивность клеток до $4,58 \pm 1,62$ пг/(клетка×сут). При культивировании лидерного клона-продуцента, коэкспрессирующего арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент, в условиях периодического культивирования с подпиткой длительностью 12 сут достигнуто увеличение выхода активного лизосомального фермента арилсульфатазы В до 420 мг/л при добавлении в ростовую среду сульфата меди в концентрации 300 мкМ. **Выводы:** культивирование клонов-продуцентов, коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент, в условиях периодического культивирования с подпиткой и с добавлением в среду сульфата меди приводит к значительному улучшению ростовых свойств клеточной линии и выхода целевого фермента. Данный подход в подборе условий культивирования продуцентов можно применять к другим ферментам подкласса сульфатаз.

Ключевые слова: арилсульфатаза В; клон-продуцент; условия культивирования; формилглицин-генерирующий фермент; ген *SUMF1*; мукополисахаридоз VI типа

© С.С. Тимонова, К.А. Смолова, И.А. Кирик, М.С. Пантюшенко, Р.Л. Анисимов, Р.А. Хамитов, А.А. Пискунов, В.Н. Бадэ, 2022

Для цитирования: Тимонова С.С., Смолова К.А., Кирик И.А., Пантюшенко М.С., Анисимов Р.Л., Хамитов Р.А., Пискунов А.А., Бадэ В.Н. Оптимизация условий культивирования клона-продуцента, коэкспрессирующего арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент, с целью повышения выхода фермента арилсульфатазы В. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2022;22(3):279–292. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-279-292>

Optimisation of culture conditions for a producer clone coexpressing arylsulfatase B and a formylglycine-generating enzyme in order to increase the yield of arylsulfatase B

S.S. Timonova , K.A. Smolova, I.A. Kirik, M.S. Pantyushenko, R.L. Anisimov, R.A. Khamitov, A.A. Piskunov, V.N. Bade

JSC "GENERIUM", 14 Vladimirskaya St., Volginsky town, Petushinskiy District, Vladimir Region 601125, Russian Federation

 Sofia S. Timonova; timonova1993@yandex.ru

Abstract

Maroteaux–Lamy syndrome (mucopolysaccharidosis type VI) is an orphan genetic disease caused by mutations in the arylsulfatase B gene (*ARSB*), which encodes the lysosomal enzyme arylsulfatase B (ASB). The relevance of the study lies in the need of a Russian recombinant ASB product for patients with the disease in the Russian Federation. Previously, the authors have developed producer lines coexpressing the target ASB enzyme with an auxiliary formylglycine-generating enzyme (FGE), based on Chinese hamster ovary (CHO) cells. Further development of the recombinant ASB preparation places priority on increasing the enzyme yield. **The aim of this study** was to increase the productivity of producer clones by optimising the culture process and adding calcium chloride and copper sulfate to the culture medium. **Materials and methods:** a suspension-adapted CHO cell line was used. Monoclonal cell lines were developed using Cell Metric and ClonePix FL systems. The concentration of ASB in the culture liquid was determined using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The authors analysed batch culture and/or fed-batch culture in media supplemented with various concentrations of copper sulfate and calcium chloride. **Results:** the combined addition of copper sulfate and calcium chloride at concentrations of 300 μM during batch culture of producer clones coexpressing ASB and FGE increases viability and specific productivity of the cells up to 4.58 ± 1.62 pg/(cell \times day). The cultivation of the lead producer clone coexpressing ASB and FGE under fed-batch conditions for 12 days and the addition of copper sulfate to the growth medium at the concentration of 300 μM allow for increasing the yield of the active lysosomal enzyme, arylsulfatase B, to 420 mg/L. **Conclusions:** the cultivation of producer clones coexpressing ASB and FGE under fed-batch conditions with copper sulfate added to the medium significantly improves cell line growth properties and the ASB yield. This approach to the selection of culture conditions for producer cell lines can be applied to other enzymes of the sulfatase family.

Key words: arylsulfatase B; producer clone; culture conditions; formylglycine-generating enzyme; *SUMF1* gene; mucopolysaccharidosis type VI

For citation: Timonova S.S., Smolova K.A., Kirik I.A., Pantyushenko M.S., Anisimov R.L., Khamitov R.A., Piskunov A.A., Bade V.N. Optimisation of culture conditions for a producer clone coexpressing arylsulfatase B and a formylglycine-generating enzyme in order to increase the yield of arylsulfatase B. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* = *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2022;22(3):279–292. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-279-292>

Введение

Ген *ARSB* кодирует лизосомальный фермент N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазу (арилсульфатаза В, галсульфаза, ASB, EC 3.1.6.12) [1]. Мукополисахаридоз (МПС) VI типа представляет собой орфанное генетическое заболевание, которое вызвано нарушением работы или отсутствием фермента арилсульфатазы В (ASB). Основная функция фермента ASB заключается в отщеплении сульфатных остатков гликозаминогликанов (ГАГ) в лизосомах [2]. Накопление ГАГ приводит к агрегированию нерасщепленных продуктов метаболизма в тканях и органах, вызывая нарушение обмена веществ [3]. В настоящее время пациентам МПС VI типа рекомендовано лечение единственным одобренным препаратом Наглазим (BioMarin, США) [4, 5].

Для активности фермента ASB необходима посттрансляционная модификация [6–8], приводящая к изменению аминокислотного остатка цистеина (Cys) до молекулы α -формилглицин (fGly) [9, 10]. В своей структуре фермент ASB¹ имеет ион двухвалентного металла, предположительно Ca²⁺. Роль иона металла заключается в стабилизации образования сложного промежуточного сульфатного эфира во время конверсии Cys в fGly [11].

Образование fGly катализируется формилглицин-генерирующим ферментом² (FGE, EC 1.8.3.7) [12, 13]. FGE взаимодействует с развернутой вторичной структурой сульфатаз и модифицирует Cys в активном центре фермента до fGly [14, 15]. В литературе описан механизм реакции конверсии Cys в fGly под действием FGE с участием иона Cu²⁺ [16–19]. Также известно, что вспомогательный фермент FGE имеет два иона Ca²⁺ в третичной структуре белка [20, 21].

В результате предварительных работ, проведенных авторами [22], на основе суспензионной линии клеток CHO были получены клеточные линии-продуценты, коэкспрессирующие ферменты ASB и FGE (ASB+FGE), с уровнем выхода целевого фермента ASB 50–100 мг/л. Однако для дальнейшей разработки отечественного препарата на основе рекомбинантной арилсульфатазы В необходимо было оптимизировать процесс культивирования клеточной линии. Для подбора условий культивирования использовали периодическое культивирование (batch culture) и/или периодическое культивирование с подпиткой (fed-batch culture). Добавление сульфата меди как компонента, влияющего на повышение продуктивности клеточной линии и удельную активность суль-

фатазы, известно ранее на примере фермента идуронат-2-сульфатазы [23].

Цель работы – увеличение продуктивности клонов-продуцентов за счет оптимизации процесса культивирования и добавления в культуральную среду хлорида кальция и сульфата меди. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи: изучение влияния добавления в культуральную среду различных концентраций сульфата меди и хлорида кальция на выход целевого фермента ASB при культивировании мини-пулов-продуцентов ASB+FGE; изучение влияния добавления хлорида кальция и сульфата меди на ростовые и продукционные характеристики панели клонов-продуцентов ASB+FGE; оптимизация условий культивирования лидерного клона-продуцента ASB+FGE с целью повышения выхода целевого фермента ASB; сравнение и анализ результатов активности очищенного фермента и продуктивности полученных клеточных линий.

Материалы и методы

Материалы

Клетки яичника китайского хомячка (CHO-K1) получены из коллекции клеточных культур НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика и адаптированы к условиям суспензионного культивирования без использования белков животного происхождения.

В работе использовали следующие основные реактивы: полутвердая среда для клонирования ClonaCell Flex (Stemcell, Канада); среда для культивирования BalanCD CHO Growth A (BCD) (FUJIFILM Irvine Scientific, США); подпитка BalanCD CHO Feed 4 (FUJIFILM Irvine Scientific, США); поликлональные крысиные антитела против ASB (anti-ASB, АО «ГЕНЕРИУМ», Россия); 4-метилумбеллиферилсульфата калиевая соль (Sigma, Япония); крысиные антитела против ASB, конъюгированные с пероксидазой хрена (anti-ASB-HRP, АО «ГЕНЕРИУМ», Россия); стандарт 4-метилумбеллиферона (Sigma, Япония).

Методы

Получение плазмид с генами, кодирующими арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент. Синтетические последовательности генов *ARSB* и *SUMF1* клонировали в экспрессионные векторы с разными селективными маркерами, как описано авторами ранее [22].

Суспензионное культивирование клеток линии CHO. Клетки линии CHO-K1 были адаптирова-

¹ <https://www.uniprot.org/uniprot/P15848>

² <https://www.uniprot.org/uniprot/Q8NBK3>

ны к суспензионному культивированию в среде, не содержащей сыворотку или другие компоненты животного происхождения. Использовали ростовую среду BalanCD CHO Growth A (FUJIFILM Irvine Scientific, США). Условия культивирования в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония): 37 °С, влажность более 75%, 5% CO₂.

Определение ростовых характеристик клеточных культур. Жизнеспособность культуры и плотность жизнеспособных клеток (VCD, viable cell density) измеряли с помощью счетчика клеток Countess II FL Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific, США); удельную продуктивность (Qp) и кумулятивную клеточную плотность (CCD) рассчитывали, как описано ранее [22, 24].

Получение клонов-продуцентов арилсульфатазы В. Клетки минипула, экспрессирующие фермент ASB, были клонированы методом предельного разведения в ростовой среде BCD в 96-луночных планшетах с концентрацией 5 клеток/мл. Для отслеживания роста клонов клеток использовали систему клеточной визуализации Cell Metric (Solentim, Великобритания). Планшеты с клеточными клонами инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 12 сут в стационарных условиях: 37 °С, 70% влажность, 5% CO₂. Визуализацию и фотодокументирование роста клеточных клонов осуществляли через 4 часа после посева клеток, через 24 ч, 48 ч и далее на 7 и 12 сут роста клонов.

Получение минипулов-продуцентов, коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент. Клетки линии CHO были трансфицированы двумя плазмидами, кодирующими гены ферментов ASB и FGE (плазмиды вносили в соотношении, равном 90:10%). Трансфицированные клетки высевали в концентрации 5,0×10⁴ клеток/мл в плоскодонные 96-луночные планшеты по 100 мкл/лунку в среде BCD с селективными антибиотиками. Затем проводили скрининг по продуктивности минипулов из 96-луночных планшетов, после чего минипулы с самой высокой продуктивностью переводили в больший объем 6-луночных планшетов. Далее проводили скрининг минипулов из 6-луночных планшетов, после чего переводили минипулы с максимальной продуктивностью в колбы для адаптации роста, как описано авторами ранее [22].

Получение клонов-продуцентов, коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент. Клетки минипулов, коэкспрессирующих два фермента, ASB и FGE, были клонированы в полутвердую среду ClonaCell Flex (Stemcell, Канада) с посевной концентрацией 10 клеток/мл. Для приготовления полу-

твердой среды для клонирования использовали среду BCD и двухдневную кондиционированную среду исходного минипула. Планшеты с растущими колониями клонов инкубировали 10 сут в условиях CO₂-инкубатора: при 37 °С, 70% влажности и 5% CO₂. Отбор клонов проводили с помощью роботизированной системы Clone Pix FL (Molecular Devices, США).

Криоконсервация клеточных клонов. Клеточную суспензию осаждали центрифугированием при 180 g в течение 5 мин, супернатант удаляли, к осадку клеток добавляли среду BCD с 10% диметилсульфоксидом (Sigma, Япония). Клетки клонов замораживали в концентрации 1,0×10⁷ клеток/мл, после чего помещали криоампулы в сосуд с парами жидкого азота.

Иммуноферментный анализ. Концентрацию ASB в культуральной жидкости определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с применением 96-луночных планшетов с высокой сорбционной способностью MaxiSorp (Thermo Scientific Nunc, Дания). Поликлональные крысиные антитела anti-ASB (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия) использовали в качестве сорбирующих антител. Поликлональные крысиные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, anti-ASB-HRP (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия) использовали в качестве детектирующих антител. Стандарт – фермент галсульфаза Наглазим (BioMarin, США). Измерения проводили с помощью спектрофотометра Benchmark Plus при 450 нм (Bio-Rad Laboratories, США).

Периодическое культивирование проводили в биореакторе TubeSpin Bioreactor 50 (TPP Techno Plastic Products AG, Швейцария). Посевная концентрация клеток составляла 0,3×10⁶ клеток/мл; в качестве ростовой среды использовали BCD при культивировании в следующих условиях: 5% CO₂, 37 °С, при 200 об/мин на шейкер-инкубаторе Climo-Shaker ISF1-XC (Kuhner, Германия) [22]. Культивирование продуцентов проводили с добавлением в ростовую среду сульфата меди в концентрации 300 мкМ и/или хлорида кальция в концентрации 300 мкМ. В качестве контроля использовали среду BCD.

Периодическое культивирование с подпиткой проводили в колбах Эрленмейера (Corning, США) в ростовой среде BCD в условиях 5% CO₂, 37 °С, снижая температуру до 30 °С на 6 сут процесса. Для культивирования продуцентов использовали шейкер-инкубатор Multitron (Infors HT, Швейцария) при 150 об/мин. Посевная концентрация клеток: 0,3×10⁶ клеток/мл. Подпитку осуществляли компонентом BalanCD CHO Feed 4 (FUJIFILM Irvine Scientific, США) 3% от объема каждые сутки начиная с 4 сут культивирования. Концентрацию

глюкозы поддерживали на уровне не ниже 3 г/л с 4 сут культивирования до конца процесса. Во время культивирования в ростовую среду добавляли сульфат меди и/или хлорид кальция в различных концентрациях. В качестве контроля использовали среду BCD.

Определение уровня лактата и глюкозы. Для определения уровня лактата и глюкозы в культуральной жидкости использовали анализатор Biosen C-line (EKF-diagnostic GmbH, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Измерение активности арилсульфатазы В. Активность фермента ASB оценивали по способности фермента отщеплять сульфатные остатки от субстрата – 4-метилумбеллиферилсульфата калиевой соли (Sigma, Япония). Единицей активности фермента ASB считали количество фермента, способного катализировать расщепление 1 мкмоль субстрата 4-метилумбеллиферилсульфата калиевой соли при 37 °С, pH 4,9–5,1, в течение 1 мин [22].

Хроматографическая очистка арилсульфатазы В. Для очистки ASB использовали три стадии выделения. На первом этапе целевой белок из культуральной жидкости сорбировали на аффинном сорбенте Con A Sepharose (Cytiva, Швеция). Далее фермент доочищали с помощью металл-хелатной хроматографии с использованием носителя IMAC Sepharose FF (Cytiva, Швеция) с иммобилизованными ионами меди и последующей катионообменной хроматографии с использованием носителя SP Sepharose (Cytiva, Швеция), как описано авторами ранее [22].

Статистическая обработка данных была выполнена с помощью программы GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США). Использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA тест) или *t*-критерий Стьюдента. Достоверность отличий обозначали: * $p_{\text{values}} < 0,05$, ** $p_{\text{values}} < 0,01$, *** $p_{\text{values}} < 0,001$, **** $p_{\text{values}} < 0,0001$ или ns – нет статистической разницы. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (SD).

Результаты и обсуждение

Изучение влияния добавления в культуральную среду различных концентраций сульфата меди и хлорида кальция на выход целевого фермента арилсульфатазы В при культивировании минипулов-продуцентов, коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент

Для повышения продуктивности лидерных минипулов-продуцентов ASB+FGE, полученных авторами ранее [22], проводили изучение влияния

добавления в культуральную среду различных концентраций сульфата меди и хлорида кальция. Выбор данных компонентов основан на ранее проведенных исследованиях, а также данных литературы. Известно, что добавление сульфата меди в ростовую среду увеличивает специфическую активность фермента идуронат-2-сульфатазы [18], который относится к подклассу ферментов сульфатаз, так же как изучаемый в работе фермент ASB. Кроме того, описан механизм реакции конверсии цистеина в формилглицин в активном центре ASB с участием фермента FGE, кофактором которого являются ионы Cu^{2+} [19]. О роли ионов Ca^{2+} известно из данных литературы – в структуре целевого фермента ASB, так и вспомогательного фермента FGE имеются ионы Ca^{2+} [11, 20, 21]. Исходя из описанных данных, нами было выдвинуто предположение о влиянии добавления ионов Ca^{2+} и Cu^{2+} в ростовую среду на продуктивность минипулов-продуцентов ASB+FGE.

Минипулы-продуценты ASB+FGE культивировали в течение 5 сут с добавлением в различных концентрациях как отдельно сульфата меди или хлорида кальция, так и в комбинации данных солей (рис. 1). Минимальная концентрация солей в ростовой среде составляла 30 мкМ, максимальная концентрация – 300–500 мкМ. Следует отметить, что при добавлении в ростовую среду сульфата меди и хлорида кальция как отдельно, так и в комбинации в концентрации 30–50 мкМ статистически значимого увеличения продуктивности клеточной линии не наблюдали. При добавлении в среду культивирования 500 мкМ сульфата меди было отмечено снижение жизнеспособности минипулов-продуцентов ASB+FGE ниже 30% (данные не приведены). Максимальный прирост продуктивности минипула-продуцента ASB+FGE до $55,7 \pm 7,9$ мг/л наблюдали при культивировании в условиях добавления сульфата меди в концентрации 300 мкМ – увеличение продуктивности составило 66% (рис. 1, вариант 1) относительно контрольных условий культивирования без добавления солей (control; продуктивность $33,5 \pm 0,8$ мг/л). Добавление в ростовую среду хлорида кальция в концентрации 300 мкМ приводило к повышению продуктивности до $45,9 \pm 1,5$ мг/л (прирост продуктивности около 37%), однако статистически значимого отличия от контрольных условий в данном случае не выявлено. Следует отметить значительное увеличение выхода фермента ($51,8 \pm 3,4$ мг/л) при условии совместного добавления сульфата меди и хлорида кальция в концентрациях 300 мкМ, при котором наблюдали статистически достоверное увеличение продуктивности на 52% (рис. 1, вариант 3).

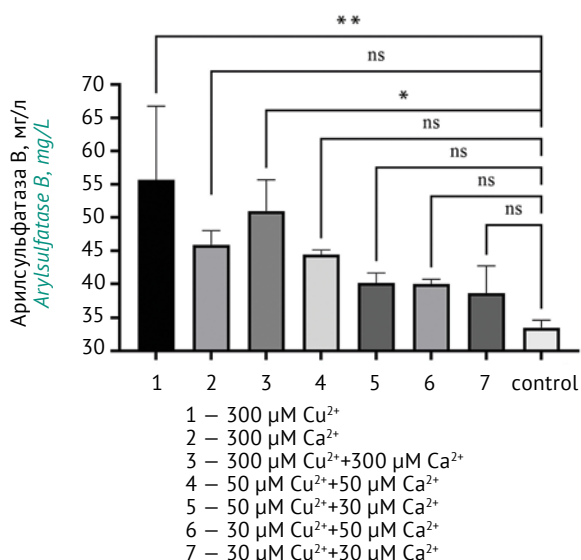


Рис. 1. Продуктивность минипулов-продуцентов ASB+FGE на 5 сут культивирования при различных вариантах добавления сульфата меди и хлорида кальция. В легенде описаны варианты (1–7) культивирования. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. p_{values} рассчитывали с помощью теста one-way ANOVA, используя в качестве контроля (control) группу ASB+FGE без добавления солей (* $p_{\text{values}} < 0,05$; ** $p_{\text{values}} < 0,01$; ns – нет статистически значимых отличий).

Fig. 1. Productivity of ASB+FGE-expressing mini-pools on culture day 5 with different amounts of added copper sulfate and calcium chloride. The legend describes culture variants (1–7). Data are presented as mean and standard deviation values. p_{values} are calculated using the one-way ANOVA test with the ASB+FGE group with no added salts as the control (* $p_{\text{values}} < 0.05$; ** $p_{\text{values}} < 0.01$; ns – no statistical difference).

По результатам проведенного эксперимента оптимальным вариантом культивирования минипулов-продуцентов ASB+FGE признано культивирование с добавлением в ростовую среду сульфата меди и хлорида кальция (отдельно и в комбинации) в концентрации 300 мкМ.

Далее в работе проводили получение клонов-продуцентов (клонов-продуцентов ASB и клонов-продуцентов, коэкспрессирующих ASB и FGE), а также изучение влияния добавления в ростовую среду сульфата меди и хлорида кальция на жизнеспособность и продуктивность полученных клонов-продуцентов.

Изучение влияния добавления хлорида кальция и сульфата меди на ростовые и продукционные характеристики панели клонов-продуцентов, коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент

Для изучения влияния добавления хлорида кальция и сульфата меди на ростовые и продукционные характеристики восьми клонов-продуцентов, коэкспрессирующих ASB и FGE, было

проведено периодическое культивирование в среде с различными вариантами добавок (рис. 2). В качестве контрольных условий использовали ростовую среду BCD.

При добавлении сульфата меди в ростовую среду наблюдали повышение жизнеспособности клонов-продуцентов ASB+FGE (рис. 2А), увеличение клеточной плотности (рис. 2В) и продуктивности клонов (рис. 2С). При этом максимальное значение продуктивности достигало 150 мг/л.

Добавление хлорида кальция как отдельного компонента в ростовую среду привело к повышению жизнеспособности клонов-продуцентов в среднем на 10% на протяжении всего процесса культивирования (рис. 2А, $p_{\text{values}} < 0,05$).

Добавление двух компонентов, сульфата меди и хлорида кальция, в ростовую среду привело к повышению жизнеспособности клонов-продуцентов в среднем на 15% по сравнению с контрольными условиями на протяжении всего процесса культивирования (рис. 2А). Также при добавлении в ростовую среду одновременно двух компонентов наблюдали рост удельной продуктивности клонов-продуцентов ASB+FGE (рис. 2D) до значений $4,58 \pm 1,62$ пг/(клетка×сут) по сравнению с вариантом культивирования в присутствии сульфата меди, $3,62 \pm 0,64$ пг/(клетка×сут). Следует отметить, что максимальное значение удельной продуктивности достигло $9,30$ пг/(клетка×сут) (рис. 2D).

Потребление глюкозы более интенсивно проходило при добавлении сульфата меди (рис. 2E) и как отдельного компонента, и совместно с хлоридом кальция, что связано с высокой клеточной плотностью клонов-продуцентов (рис. 2В). Уровень лактата в культуральной жидкости во всех условиях статистически не различался (рис. 2F).

Таким образом, в результате проведенного эксперимента было продемонстрировано, что добавление в ростовую среду сульфата меди и хлорида кальция положительно влияет на удельную продуктивность клеточных линий и жизнеспособность клонов-продуцентов ASB+FGE. По-видимому, данный эффект объясняется тем, что одновременное добавление в среду (в качестве компонентов) ионов Ca^{2+} и Cu^{2+} , входящих в структуру активных центров целевого и вспомогательного ферментов [11, 16–21], благоприятно влияет на конфигурацию и стабильность ASB.

Исходя из полученных результатов, следующий этап исследований с лидерным клоном-продуцентом в условиях его периодического культивирования с подпиткой проводили с использованием двух вариантов условий культивирования: с добавлением сульфата меди и одновременным добавлением двух компонентов.

Оптимизация условий культивирования лидерного клона-продуцента, коэкспрессирующего арилсульфатазу B и формилглицин-генерирующий фермент, с целью повышения выхода целевого фермента арилсульфатазы B

Для дальнейшей оптимизации процесса культивирования из панели клонов был выбран один лидерный клон-продуцент ASB+FGE, продемонстрировавший наиболее высокий уровень

выхода целевого фермента и способность достигать высоких клеточных плотностей. Рост клона-продуцента проводили при периодическом культивировании с подпиткой длительностью 12 сут в трех вариантах условий: в ростовой среде (контроль); с добавлением сульфата меди в концентрации 300 мкМ; с одновременным добавлением сульфата меди в концентрации 300 мкМ и хлорида кальция в концентрации 300 мкМ (рис. 3).

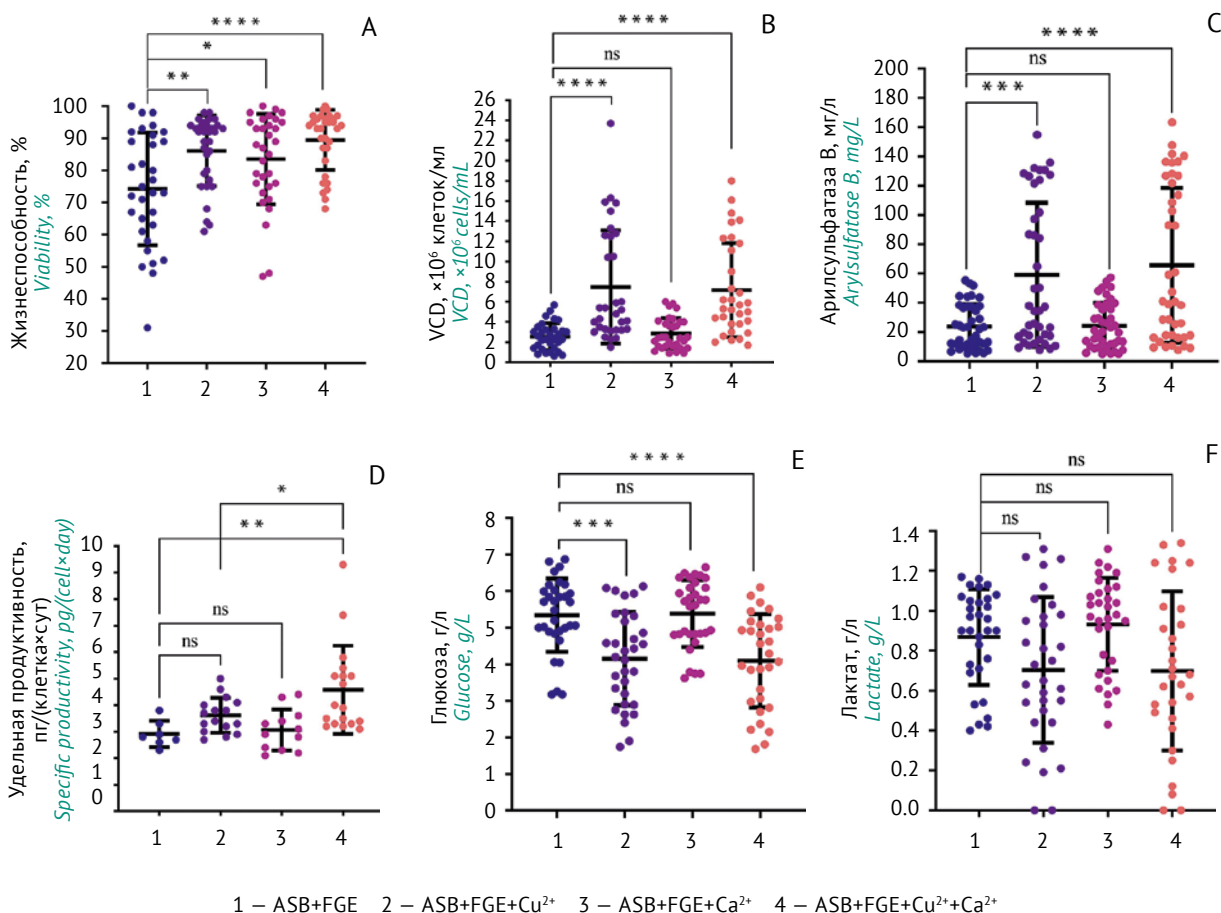


Рис. 2. Характеристики восьми клонов-продуцентов, коэкспрессирующих ферменты ASB и FGE, в процессе периодического культивирования на 4–7 сут. А – жизнеспособность клеток; В – плотность жизнеспособных клеток, VCD; С – продуктивность; D – удельная продуктивность клеток; E – концентрация глюкозы; F – концентрация лактата. Обозначения на рисунке: ASB+FGE – клоны-продуценты, коэкспрессирующие ферменты ASB+FGE, культивируемые на среде BCD; ASB+FGE+Cu²⁺ – клоны-продуценты, коэкспрессирующие ферменты ASB+FGE, культивируемые на среде BCD с добавлением сульфата меди; ASB+FGE+Ca²⁺ – клоны-продуценты, коэкспрессирующие ферменты ASB+FGE, культивируемые на среде BCD с добавлением хлорида кальция; ASB+FGE+Cu²⁺+Ca²⁺ – клоны-продуценты, коэкспрессирующие ферменты ASB+FGE, культивируемые на среде BCD с добавлением сульфата меди и хлорида кальция. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. p_{values} рассчитывали с помощью теста one-way ANOVA, используя в качестве контроля группу ASB+FGE (* $p_{\text{values}} < 0,05$, ** $p_{\text{values}} < 0,01$, *** $p_{\text{values}} < 0,001$, **** $p_{\text{values}} < 0,0001$; ns – нет статистически значимых отличий). Точками обозначены значения показателей для 8 клонов на каждые сутки культивирования с 4 по 7 сут.

Fig. 2. Characteristics of 8 producer clones coexpressing ASB and FGE enzymes on days 4–7 of batch culture. A—cell viability; B—viable cell density, VCD; C—volumetric productivity; D—specific productivity; E—glucose concentration; F—lactate concentration. Abbreviations: ASB+FGE—producer clones coexpressing ASB and FGE, cultivated in BCD; ASB+FGE+Cu²⁺—producer clones coexpressing ASB and FGE, cultivated in BCD with copper sulfate; ASB+FGE+Ca²⁺—producer clones coexpressing ASB and FGE, cultivated in BCD with calcium chloride; ASB+FGE+Cu²⁺+Ca²⁺—producer clones coexpressing ASB and FGE, cultivated in BCD with copper sulfate and calcium chloride. Data are presented as mean and standard deviation values. p_{values} are calculated using the one-way ANOVA test with the ASB+FGE group as the control (* $p_{\text{values}} < 0.05$, ** $p_{\text{values}} < 0.01$, *** $p_{\text{values}} < 0.001$, **** $p_{\text{values}} < 0.0001$; ns—no statistical difference). Dots indicate test values observed for 8 clones on each culture day (days 4 to 7).

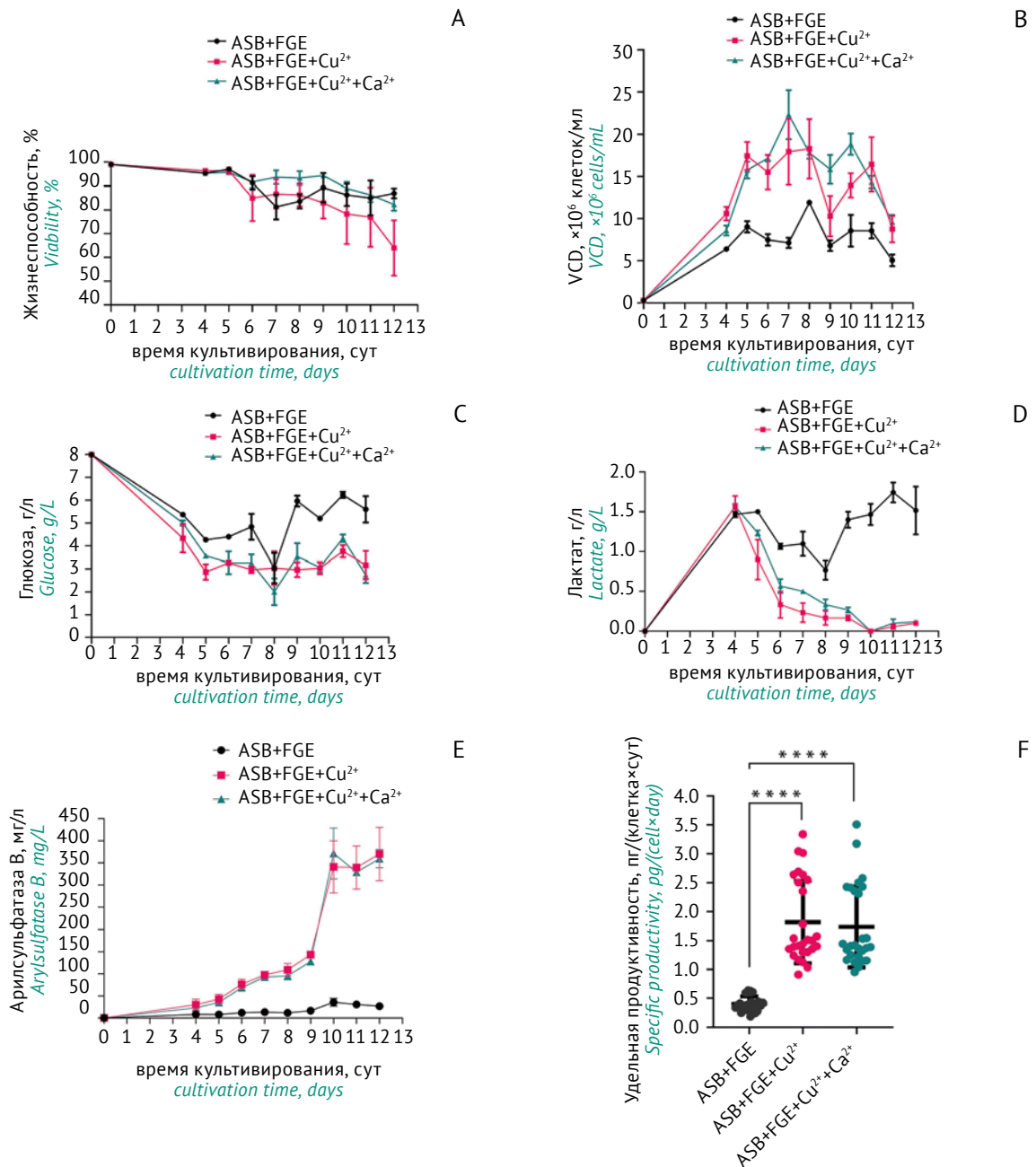


Рис. 3. Характеристики лидерного клон, коэкспрессирующего ферменты ASB и FGE в процессе периодического культивирования с подпиткой, и активность очищенного препарата ASB. А – жизнеспособность клеток; В – плотность жизнеспособных клеток, VCD; С – концентрация глюкозы; D – концентрация лактата; E – продуктивность клон; F – удельная продуктивность клеток с 4 по 12 сут. Обозначения на рисунке: ASB+FGE – клон-продуцент, коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE, культивируемые на среде BCD; ASB+FGE+Cu²⁺ – клон-продуцент, коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди; ASB+FGE+Cu²⁺+Ca²⁺ – клон-продуцент, коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди и хлорида кальция. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. *p*_{values} рассчитывали с помощью теста one-way ANOVA; в качестве контроля использовали группу ASB+FGE (**** *p*_{values} < 0,0001). Точками обозначены значения удельной продуктивности клонов с 4 по 12 сут культивирования в трех повторях.

Fig. 3. Characteristics of the lead clone coexpressing ASB and FGE enzymes during fed-batch culture and the specific enzyme activity of the purified ASB preparation. A–cell viability; B–viable cell density, VCD; C–glucose concentration; D–lactate concentration; E–volumetric productivity; F–specific productivity of the cells on days 4 to 12 of fed-batch culture. Abbreviations: ASB+FGE–producer clones coexpressing ASB and FGE, cultivated in BCD; ASB+FGE+Cu²⁺–producer clone coexpressing ASB and FGE, cultivated in BCD with copper sulfate; ASB+FGE+Cu²⁺+Ca²⁺–producer clone coexpressing ASB and FGE, cultivated in BCD with copper sulfate and calcium chloride. Data are presented as mean and standard deviation values. *p*_{values} are calculated using the one-way ANOVA test with the ASB+FGE group as the control (**** *p*_{values} < 0.0001). Dots indicate specific productivity values observed for the clones on culture days 4–12; the experiment was conducted in triplicate.

В условиях культивирования с одновременным добавлением сульфата меди и хлорида кальция наблюдали высокую жизнеспособность на протяжении всего периода культивирования, которая составляла более 80% (рис. 3A).

При добавлении сульфата меди и/или одновременно двух компонентов солей наблюдали увеличение плотности жизнеспособных клеток до $\sim(16,55\pm 2,29)\times 10^6$ клеток/мл (рис. 3B). Ранее было показано, что добавление хлорида кальция не способствует росту плотности жизнеспособных клеток, поэтому можно сделать вывод, что на увеличение плотности жизнеспособных клеток влияет добавление ионов меди в ростовую среду. Возможным объяснением данного эффекта является то, что добавление ионов меди в ростовую среду влияет на активность вспомогательного FGE фермента [16–19], способствуя биосинтезу сверхэкспрессированной лизосомальной сульфатазы ASB, обеспечивая правильный фолдинг и последующую секрецию в культуральную жидкость (рис. 3B, ASB+FGE+Cu²⁺/ASB+FGE+Cu²⁺+Ca²⁺). Вероятно, поэтому можно наблюдать низкую плотность жизнеспособных клеток $\sim(8,40\pm 1,84)\times 10^6$ при культивировании в контрольных условиях, где, возможно, ASB с неправильным фолдингом накапливается в эндоплазматическом ретикулуме и/или цитоплазме и, как следствие, оказывает токсическое действие на клетку (рис. 4B, ASB+FGE) [25].

Как правило, потребление глюкозы и накопление лактата в культуральной жидкости являются показателями метаболической активности клеток [26, 27]. Чаще всего накопление лактата в культуральной жидкости приводит к ингибированию роста клеток и, как следствие, снижению продукции целевого белка [28]. Однако существует метаболический процесс, при котором клетки клона начинают одновременно потреблять и лактат, и глюкозу [29]. Для промышленных процессов периодического культивирования такие клоны-продуценты являются более предпочтительными, так как в данном случае происходит более эффективное потребление питательных веществ и достигается высокий выход продукта за счет увеличения длительности процесса культивирования и высоких клеточных плотностей. Помимо вышеперечисленного, в ряде работ показано, что добавление в ростовую среду сульфата меди способствует увеличению выхода продукта, плотности жизнеспособных клеток и жизнеспособности культуры за счет снижения уровня белков клеточного стресса [30]. В ходе проведенного исследования было обнаружено, что лидерный клон-продуцент ASB+FGE с добавлением в ростовую

среду двух компонентов активно потреблял одновременно и глюкозу, и лактат в стационарной фазе процесса культивирования (рис. 3C, 4D), в то время как этот же клон-продуцент без добавления компонентов был не способен утилизировать лактат, который накапливается в культуральной жидкости во время культивирования (рис. 3C).

Кроме того, было показано, что добавление в ростовую среду сульфата меди привело к повышению продуктивности и удельной продуктивности клона-продуцента ASB+FGE в сравнении с контрольными условиями в среднем с $31,04\pm 7,05$ до $350,20\pm 48,19$ мг/л и с $0,41\pm 0,13$ до $1,82\pm 0,70$ пг/(клетка×сут) соответственно (рис. 3E, 3F). Следует отметить, что максимальное значение продуктивности лидерного клона-продуцента достигало 420 мг/л, а максимальное значение удельной продуктивности – $3,50$ пг/(клетка×сут).

Изучение влияния сульфата меди и хлорида кальция на продуктивность, ростовые характеристики и метаболизм клон-продуцента арилсульфатазы B

Культивирование клон-продуцента ASB проводили в режиме периодического культивирования в трех вариантах условий: в стандартной ростовой среде (контроль); с добавлением сульфата меди в концентрации 300 мкМ; с одновременным добавлением сульфата меди в концентрации 300 мкМ и хлорида кальция в концентрации 300 мкМ (рис. 4).

Во всех трех вариантах условий культивирования не наблюдалось изменения ростовых характеристик клон-продуцента ASB на протяжении процесса культивирования. Жизнеспособность клеток клон-продуцента снижалась на 7 сут процесса (рис. 4A), максимальная плотность жизнеспособных клеток (показатель VCD) на 6 сут культивирования достигала около $(13,0\pm 1,51)\times 10^6$ клеток/мл (рис. 4C). Временные зависимости уровней глюкозы и лактата представлены на рисунке 4B и 4D.

Несмотря на схожие ростовые характеристики клон-продуцента ASB в разных условиях культивирования, было выявлено трехкратное увеличение продуктивности клеточной линии с $1,93\pm 0,27$ до $6,77\pm 1,01$ мг/л (рис. 4E) и повышение удельной продуктивности клеток с $0,04\pm 0,01$ до $0,13\pm 0,01$ пг/(клетка×сут) при добавлении в ростовую среду сульфата меди (рис. 4F).

При добавлении двух компонентов активность ASB в культуральной жидкости в среднем составила $0,047\pm 0,009$ ЕД/мл, что выше

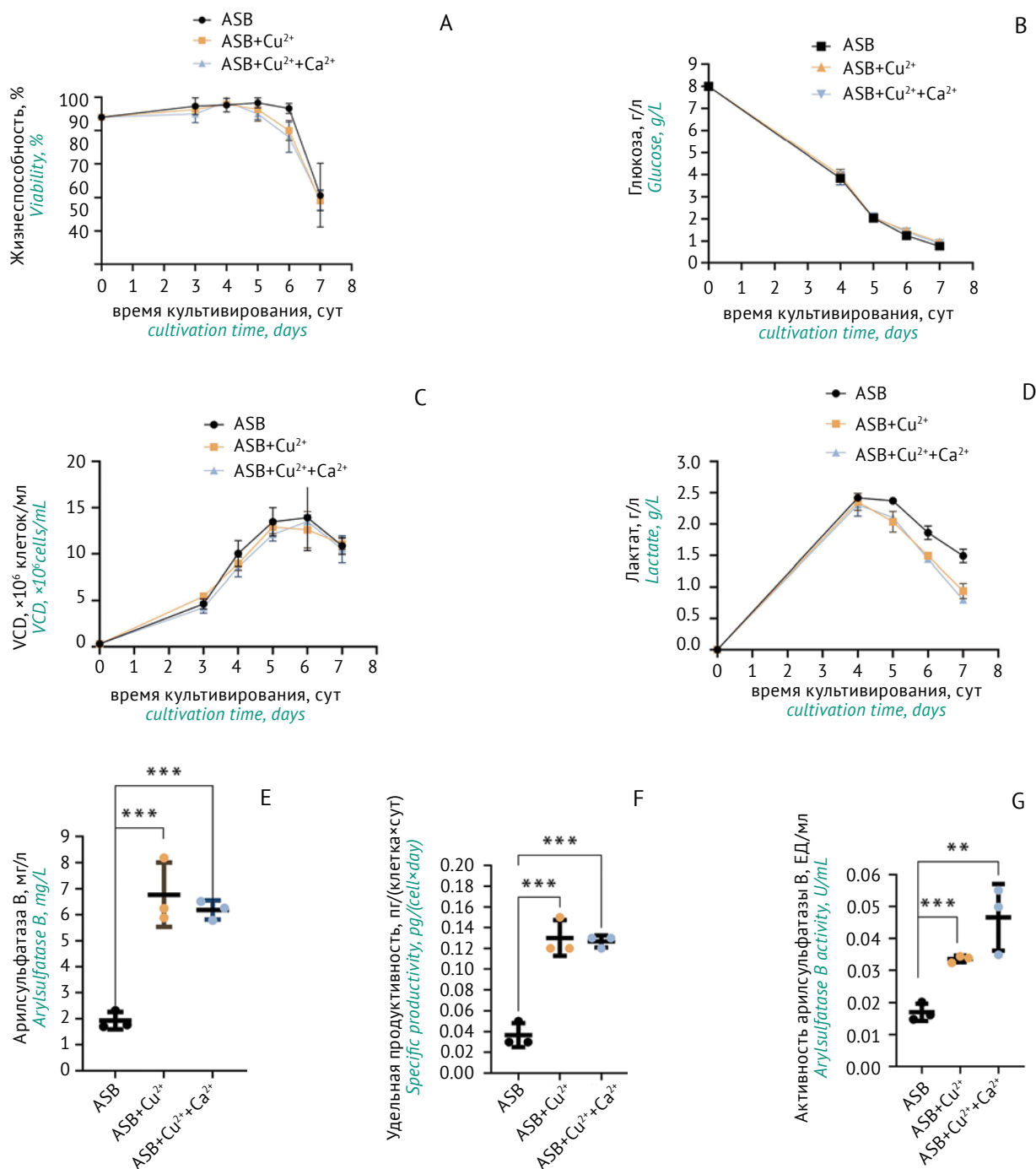


Рис. 4. Характеристики клона-продуцента ASB в процессе периодического культивирования. А – жизнеспособность клеток; В – плотность жизнеспособных клеток, VCD; С – концентрация глюкозы; D – концентрация лактата; E – продуктивность; F – удельная продуктивность клеток; G – активность ASB в культуральной жидкости. Обозначения на рисунке: ASB – клон-продуцент ASB, культивируемый на среде BCD; ASB+Cu²⁺ – клон-продуцент ASB, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди; ASB+Cu²⁺+Ca²⁺ – клон-продуцент ASB, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди и хлорида кальция. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. p_{values} рассчитывали с помощью теста one-way ANOVA, используя в качестве контроля группу ASB (** $p_{\text{values}} < 0,01$, *** $p_{\text{values}} < 0,001$). Точками обозначены значения исследуемых показателей в трех повторах.

Fig. 4. Characteristics of the ASB-producing clone during batch culture. A–cell viability; B–viable cell density, VCD; C–glucose concentration; D–lactate concentration; E–volumetric productivity; F–specific productivity; G–ASB activity in the culture medium. Abbreviations: ASB–ASB-producing clone cultivated in BCD; ASB+Cu²⁺–ASB-producing clone cultivated in BCD with copper sulfate; ASB+Cu²⁺+Ca²⁺–ASB-producing clone cultivated in BCD with copper sulfate and calcium chloride. Data are presented as mean and standard deviation values. p_{values} are calculated using the one-way ANOVA test with the ASB group as the control (** $p_{\text{values}} < 0.01$, *** $p_{\text{values}} < 0.001$). Dots indicate test values observed; the experiment was conducted in triplicate.

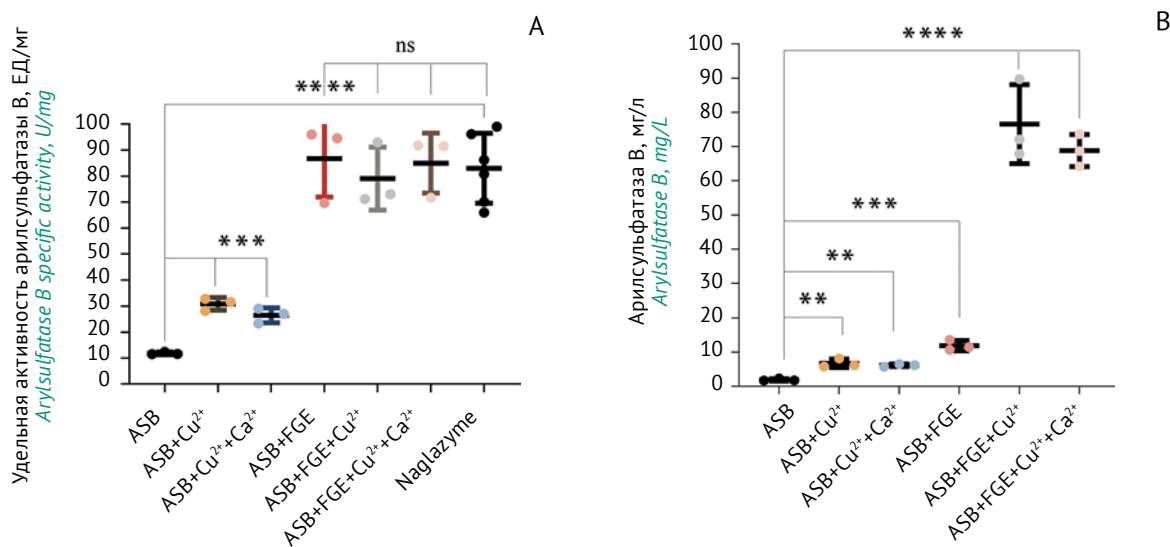


Рис. 5. Удельная активность очищенного препарата ASB и продуктивность клонов. А – удельная активность фермента ASB после хроматографической очистки; В – продуктивность клонов на 6 сут процесса культивирования. Обозначения на рисунке: ASB – клон-продуцент ASB, культивируемый на среде BCD; ASB+Cu²⁺ – клон-продуцент ASB, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди; ASB+Cu²⁺+Ca²⁺ – клон-продуцент ASB, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди и хлорида кальция; ASB+FGE – клон-продуцент, коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE, культивируемый на среде BCD; ASB+FGE+Cu²⁺ – клон-продуцент, коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди; ASB+FGE+Cu²⁺+Ca²⁺ – клон-продуцент, коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди и хлорида кальция; Naglazyme – препарат галсульфазы Наглазим. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. p_{values} рассчитывали с помощью теста one-way ANOVA; в качестве контроля использовали условие ASB (** $p_{\text{values}} < 0,01$, *** $p_{\text{values}} < 0,001$, **** $p_{\text{values}} < 0,0001$; ns – нет статистической разницы). Точками обозначены значения исследуемых показателей клонов в трех повторях.

Fig. 5. Specific activity of the purified ASB preparation and productivity of clones. A–specific activity of ASB after chromatographic purification; B–productivity on culture day 6. Abbreviations: ASB–ASB-producing clone cultivated in BCD; ASB+Cu²⁺–ASB-producing clone cultivated in BCD with copper sulfate; ASB+Cu²⁺+Ca²⁺–ASB-producing clone cultivated in BCD with copper sulfate and calcium chloride; ASB+FGE–producer clone coexpressing ASB and FGE enzymes, cultivated in BCD; ASB+FGE+Cu²⁺– producer clone coexpressing ASB and FGE enzymes, cultivated in BCD with copper sulfate; ASB+FGE+Cu²⁺+Ca²⁺–producer clone coexpressing ASB and FGE enzymes, cultivated in BCD with copper sulfate and calcium chloride; Naglazyme–galsulfase medicinal product. Data are presented as mean and standard deviation values. p_{values} are calculated using the one-way ANOVA test with the ASB group as the control (** $p_{\text{values}} < 0.01$, *** $p_{\text{values}} < 0.001$, **** $p_{\text{values}} < 0.0001$; ns–no statistical difference). Dots indicate test values observed for the clones; the experiment was conducted in triplicate.

в 2,7 раза в сравнении с контрольными условиями – $0,017 \pm 0,002$ ЕД/мл (рис. 4Г).

Было показано, что добавление в ростовую среду сульфата меди и одновременное добавление сульфата меди и хлорида кальция в концентрации 300 мкМ приводит к повышению продуктивности и активности фермента клон-продуцента, экспрессирующего один фермент ASB. Полученные результаты соотносятся с известными данными литературы [9, 11, 18, 19].

Изучение активности фермента арилсульфатазы В и продуктивности клон-продуцента арилсульфатазы В и клон-продуцента, коэкспрессирующего арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент

На рисунке 5А представлены данные активности очищенного препарата фермента ASB, полученного при культивировании клон-про-

дучента ASB и клон-продуцента ASB+FGE. Удельная активность хроматографически очищенного препарата ASB, полученного в условиях периодического культивирования клон ASB без добавления солей металлов, в среднем составляла около $11,85 \pm 0,42$ ЕД/мг (рис. 5А, ASB). Добавление сульфата меди увеличивало активность фермента приблизительно в 3 раза до $30,85 \pm 1,96$ ЕД/мг (рис. 5А, ASB+Cu²⁺). Благодаря коэкспрессии ферментов ASB и FGE удалось значительно повысить удельную активность ASB до 70–90 ЕД/мг (рис. 5А); активность полученного фермента ASB в этом случае соответствовала активности коммерчески доступного препарата сравнения Наглазим.

Таким образом, описанные результаты свидетельствуют о том, что значительный вклад в увеличение активности фермента ASB достигается за счет модификации клеточной линии вспомогательным ферментом FGE.

На рисунке 5В представлены данные продуктивности клона ASB и клона ASB+FGE на 6 сут культивирования продуцентов. Продемонстрировано, что наибольшее увеличение выхода целевого фермента ASB достигалось при добавлении в ростовую среду при культивировании клона-продуцента, модифицированного ферментом FGE, сульфата меди в концентрации 300 мкМ.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что значительное увеличение выхода целевого фермента ASB достигается за счет следующих факторов: влияние на активный центр целевого фермента ASB (модификация клеточной линии путем коэкспрессии фермента FGE приводит к достижению стабильной высокой активности ASB и увеличению продуктивности клона-продуцента) и влияние на активный центр вспомогательного фермента FGE (добавление в ростовую среду сульфата меди приводит к дополнительному увеличению продуктивности целевого фермента ASB).

Таким образом, в экспериментальной работе выявлены критические факторы, влияющие на выход рекомбинантного фермента ASB. Разработанная технология получения и культивирования клона-продуцента ASB+FGE может быть использована при наработке фермента для проведения доклинических и клинических исследований.

Выводы

1. Получены моноклональные клоны-продуценты, коэкспрессирующие арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент, на основе суспензионной линии клеток CHO

Литература/References

1. Remondino RG, Tello CA, Noel M, Wilson AF, Galarretto E, Bersusky E, Piantoni L. Clinical manifestations and surgical management of spinal lesions in patients with mucopolysaccharidosis: a report of 52 cases. *Spine Deform.* 2019;7(2):298–303. <https://doi.org/10.1016/j.jspd.2018.07.005>
2. Mikami T, Kitagawa H. Biosynthesis and degradation of glycans of the extracellular matrix: sulfated glycosaminoglycans, hyaluronan, and matriglycan. In: Barchi JJ, ed. *Comprehensive Glycoscience*. 2nd ed. Elsevier B.V.; 2021. P. 29–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819475-1.00018-3>
3. Mehta A, Winchester B, eds. *Lysosomal Storage Disorders: A Practical Guide*. John Wiley & Sons, Ltd.; 2012. <https://doi.org/10.1002/9781118514672>
4. Harmatz P, Hendriksz CJ, Lampe C, McGill JJ, Parini R, Leão-Teles E, et al. The effect of galsulfase enzyme replacement therapy on the growth of patients with mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *Mol Genet Metab.* 2017;122(1–2):107–12. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.03.008>
5. Garcia P, Phillips D, Johnson J, Martin K, Randolph LM, Rosenfeld H, Harmatz P. Long-term outcomes of patients with mucopolysaccharidosis VI treated with galsulfase enzyme replacement therapy since infancy. *Mol Genet Metab.* 2021;133(1):100–8. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2021.03.006>
6. de Ruijter J, de Ru MH, Wagemans T, Ijlst L, Lund AM, Orchard PJ, et al. Heparan sulfate and dermatan sulfate derived disaccharides are sensitive markers for newborn screening for mucopolysaccharidoses types I, II and III. *Mol Genet Metab.* 2012;107(4):705–10. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.09.024>
7. Baenziger JU. A major step on the road to understanding a unique posttranslational modification and its role in a genetic disease. *Cell.* 2003;113(4):421–2. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00354-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00354-4)
8. Peng J, Alam S, Radhakrishnan K, Mariappan M, Rudolph MG, May C, et al. Eukaryotic formylglycine-generating enzyme catalyses a monooxygenase type of reaction. *FEBS J.* 2015;282(17):3262–74. <https://doi.org/10.1111/febs.13347>

без использования белков животного происхождения.

2. Подобрана оптимальная концентрация сульфата меди и хлорида кальция, которая позволяет увеличить выход целевого фермента арилсульфатазы В (для клона-продуцента арилсульфатазы В и клона-продуцента, коэкспрессирующего арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент).
3. При периодическом культивировании клонов-продуцентов, коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент, при одновременном добавлении сульфата меди и хлорида кальция в концентрации 300 мкМ показано увеличение жизнеспособности культур (клонов) и повышение удельной продуктивности клеток в среднем до $4,58 \pm 1,62$ пг/(клетка×сут).
4. Разработана технология суспензионного культивирования лидерного клона-продуцента, коэкспрессирующего арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент, позволяющая достигать выхода активного целевого фермента арилсульфатазы В до 420 мг/л в условиях периодического культивирования с подпиткой длительностью 12 суток при добавлении в среду сульфата меди в концентрации 300 мкМ.
5. Разработанные условия культивирования для клона-продуцента, коэкспрессирующего арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент, могут быть использованы для наработки рекомбинантной арилсульфатазы В для проведения доклинических и клинических исследований.

9. Appel MJ, Bertozzi CR. Formylglycine, a post-translationally generated residue with unique catalytic capabilities and biotechnology applications. *ACS Chem Biol.* 2015;10(1):72–84. <https://doi.org/10.1021/cb500897w>
10. Dierks T, Miech C, Hummerjohann J, Schmidt B, Kertesz MA, von Figura K. Posttranslational formation of formylglycine in prokaryotic sulfatases by modification of either cysteine or serine. *J Biol Chem.* 1998;273(40):25560–4. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.25560>
11. Bond CS, Clements PR, Ashby SJ, Collyer CA, Harrop SJ, Hopwood JJ, Guss JM. Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure.* 1997;5(2):277–89. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(97\)00185-8](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(97)00185-8)
12. Dierks T, Dickmanns A, Preusser-Kunze A, Schmidt B, Mariappan M, von Figura K, et al. Molecular basis for multiple sulfatase deficiency and mechanism for formylglycine generation of the human formylglycine-generating enzyme. *Cell.* 2005;121(4):541–52. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.03.001>
13. Dickmanns A, Schmidt B, Rudolph MG, Mariappan M, Dierks T, von Figura K, Ficner R. Crystal structure of human pFGE, the paralog of the Calpha-formylglycine-generating enzyme. *J Biol Chem.* 2005;280(15):15180–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414317200>
14. Mariappan M, Preusser-Kunze A, Balleininger M, Eisele N, Schmidt B, Gande SL, et al. Expression, localization, structural, and functional characterization of pFGE, the paralog of the C α -formylglycine-generating enzyme. *J Biol Chem.* 2005;280(15):15173–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413698200>
15. Ghosh D. Three-dimensional structures of sulfatases. *Methods Enzymol.* 2005;400:273–93. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)00016-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)00016-9)
16. Holder PG, Jones LC, Drake PM, Barfield RM, Bañas S, de Hart GW, et al. Reconstitution of formylglycine-generating enzyme with copper(II) for aldehyde tag conversion. *J Biol Chem.* 2015;290(25):15730–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.652669>
17. Appel MJ, Meier KK, Lafrance-Vanasse J, Lim H, Tsai CL, Hedman B, et al. Formylglycine-generating enzyme binds substrate directly at a mononuclear Cu(I) center to initiate O₂ activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116(12):5370–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818274116>
18. York D, Baker J, Holder PG, Jones LC, Drake PM, Barfield RM, et al. Generating aldehyde-tagged antibodies with high titers and high formylglycine yields by supplementing culture media with copper(II). *BMC Biotechnol.* 2016;16:23. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0254-0>
19. Knop M, Dang TQ, Jeschke G, Seebeck FP. Copper is a cofactor of the formylglycine-generating enzyme. *Chembiochem.* 2017;18(2):161–5. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600359>
20. Roeser D, Preusser-Kunze A, Schmidt B, Gasow K, Wittmann JG, Dierks T, et al. A general binding mechanism for all human sulfatases by the formylglycine-generating enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(1):81–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507592102>
21. Schlotawa L, Wachs M, Bernhard O, Mayer FJ, Dierks T, Schmidt B, Radhakrishnan K. Recognition and ER quality control of misfolded formylglycine-generating enzyme by protein disulfide isomerase. *Cell Rep.* 2018;24(1):27–37.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.016>
22. Тимонова СС, Смолова КА, Зарипова ДТ, Пантюшенко МС, Королева МА, Анисимов РЛ и др. Увеличение продуктивности клеточной линии-производителя арилсульфатазы В за счет коэкспрессии формилглицин-генерирующего фермента. *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2022;22(1):80–93. [Timonova SS, Smolova KA, Zaripova DT, Pantyushenko MS, Koroleva MA, Anisimov RL, et al. Increasing productivity of arylsulfatase B-producing cell line by coexpression of formylglycine-generating enzyme. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2022;22(1):80–93 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-80-93>
23. Тимонова СС, Пантюшенко МС, Тихонов РВ, Пискунов АА, Бадэ ВН. Оптимизация процесса культивирования клона-производителя рекомбинантного лизосомального фермента идуронат-2-сульфатазы. *Биотехнология.* 2021;37(2):34–47. [Timonova SS, Pantyushenko MS, Tikhonov RV, Piskunov AA, Bade VN. Optimization of the cultivation process of a producer clone of the recombinant lysosomal iduronate-2-sulfatase enzyme. *Biotechnologia = Biotechnology.* 2021;37(2):34–47 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-2-34-47>
24. Muralidharan-Chari V, Wurz Z, Doyle F, Henry M, Diendorfer A, Tenenbaum SA, et al. PTSelect™: a post-transcriptional technology that enables rapid establishment of stable CHO cell lines and surveillance of clonal variation. *J Biotechnol.* 2021;325:360–71. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.09.025>
25. Christianson TM, Starr CM, Zankel TC. Overexpression of inactive arylsulphatase mutants and *in vitro* activation by light-dependent oxidation with vanadate. *Biochem J.* 2004;382(2):581–7. <https://doi.org/10.1042/BJ20040447>
26. Gupta SK, Srivastava SK, Sharma A, Nalage VHH, Salvi D, Kushwaha H, et al. Metabolic engineering of CHO cells for the development of a robust protein production platform. *PLoS One.* 2017;12(8):e0181455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181455>
27. Mulukutla BC, Yongky A, Le T, Mashek DG, Hu WS. Regulation of glucose metabolism – a perspective from cell bioprocessing. *Trends Biotechnol.* 2016;34(8):638–51. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.012>
28. Tsao YS, Cardoso AG, Condon RG, Voloch M, Lio P, Lagos JC, et al. Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism. *J Biotechnol.* 2005;118(3):316–27. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.05.016>
29. Martínez-Monge I, Comas P, Triquell J, Casablanca A, Lecina M, Paredes CJ, Cairó JJ. Concomi-

tant consumption of glucose and lactate: a novel batch production process for CHO cells. *Biochem Eng J.* 2019;151:107358. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107358>

30. Qian Y, Khattak SF, Xing Z, He A, Kayne PS, Qian NX, et al. Cell culture and gene transcription effects of copper sulfate on Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Prog.* 2011;27(4):1190–4. <https://doi.org/10.1002/btpr.630>

Вклад авторов. С.С. Тимонова – получение клеточных линий, проведение исследования, анализ данных, измерение активности ферментов, написание рукописи; К.А. Смолова – разработка метода очистки фермента; И.А. Кирик – редактирование текста рукописи; М.С. Пантюшенко – разработка ИФА и методов измерения активности ферментов; Р.Л. Анисимов – работы по молекулярной биологии, дизайн плазмид; Р.А. Хамитов – определение основного направления исследований; А.А. Пискунов – критическое обсуждение текста рукописи; В.Н. Бадэ – планирование исследования, анализ данных, доработка текста рукописи.

Благодарности. Исследование выполнено в рамках разработки биотехнологического препарата против мукополисахаридоза VI типа в АО «ГЕНЕРИУМ». Авторы выражают признательность коллегам, которые оказывали помощь в выполнении исследования.

Конфликт интересов. Р.А. Хамитов является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Authors' contributions. S.S. Timonova – development of cell lines, conducting of the study, analysis of data, measurements of enzyme activity, writing of the manuscript; K.A. Smolova – development of the enzyme purification procedure; I.A. Kirik – editing of the text of the manuscript; M.S. Pantyushenko – development of ELISA and enzyme activity assays; R.L. Anisimov – application of molecular biology techniques, design of plasmids; R.A. Khamitov – determination of the main study direction; A.A. Piskunov – critical revision of the text of the manuscript; V.N. Bade – planning of the study, analysis of data, finalisation of the text of the manuscript. **Acknowledgements.** This study was carried out as part of the development of a biotechnological product against mucopolysaccharidosis type VI at GENERIUM JSC. The authors express their gratitude to the colleagues who assisted in the study.

Conflict of interest. R.A. Khamitov is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Об авторах / Authors

Тимонова Софья Сергеевна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2733-7458>
timonova1993@yandex.ru

Смолова Ксения Александровна, канд. хим. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9135-9673>
Smolova@ibcgenerium.ru

Кирик Инесса Анатольевна, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0364-8107>
Kirik@ibcgenerium.ru

Пантюшенко Марина Семеновна, канд. биол. наук. Pantyushenko@ibcgenerium.ru

Анисимов Роман Львович, канд. биол. наук. Anisimov@ibcgenerium.ru

Хамитов Равиль Авгатович, д-р мед. наук, проф. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>
Khamitov@ibcgenerium.ru

Пискунов Александр Александрович, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5552-5419>
Piskunov@ibcgenerium.ru

Бадэ Вероника Николаевна, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9877-5220>
Bade@ibcgenerium.ru

Sofia S. Timonova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2733-7458>
timonova1993@yandex.ru

Kseniya A. Smolova, Cand. Sci. (Chem.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9135-9673>
Smolova@ibcgenerium.ru

Inessa A. Kirik, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0364-8107>
Kirik@ibcgenerium.ru

Marina S. Pantyushenko, Cand. Sci. (Biol.). Pantyushenko@ibcgenerium.ru

Roman L. Anisimov, Cand. Sci. (Biol.). Anisimov@ibcgenerium.ru

Ravil A. Khamitov, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>
Khamitov@ibcgenerium.ru

Aleksandr A. Piskunov, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5552-5419>
Piskunov@ibcgenerium.ru

Veronika N. Bade, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9877-5220>
Bade@ibcgenerium.ru

Поступила 09.03.2022

После доработки 03.08.2022

Принята к публикации 26.08.2022

Received 9 March 2022

Revised 3 August 2022

Accepted 26 August 2022