

Интернализация рекомбинантной имиглуцеразы в перитонеальные макрофаги мыши и фибробласты мыши линии L929

И. В. Лягоскин*, М. С. Пантюшенко, О. М. Стрижакова, Н. К. Кудина, Е. Ю. Прудникова, П. В. Чичканова, С. Г. Аббасова

Общество с ограниченной ответственностью
«Международный биотехнологический центр «Генериум»
ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район,
Владимирская область, 601125, Российская Федерация

Фермент-заместительная терапия (ФЗТ) является одной из самых действенных при лечении болезней лизосомального накопления. Болезнь Гоше первого типа характеризуется недостатком нативного фермента β -глюкоцереброзидазы, который возмещают внутривенными инфузиями рекомбинантного фермента (имиглуцеразы). Клетками-мишенями имиглуцеразы являются макрофаги, в которые фермент проникает посредством взаимодействия с рецепторами маннозы на клеточной мембране. Оценка интернализации ферментов клетками-мишенями представляет интерес при разработке новых и воспроизведении существующих препаратов для ФЗТ. Для этих исследований широко применяются перитонеальные и альвеолярные макрофаги, макрофаги селезенки мелких лабораторных животных (крыс и мышей). Однако получение таких клеток затрагивает этические вопросы использования лабораторных животных. Альтернативой являются перевиваемые клеточные линии млекопитающих. **Цель работы:** провести сравнительные исследования интернализации рекомбинантной имиглуцеразы в перитонеальные макрофаги мыши и фибробласты мыши линии L929. **Материалы и методы:** Церезим®, серии 7HV0913, C6214H05, 7HV0888 (Джензайм Лтд., Великобритания); Глуразим, серии 020416, 011117, 021117 (ООО «МБЦ «Генериум», Россия). В работе использовали перитонеальные макрофаги, полученные от мышей линии BALB/c, и фибробласты мыши линии L929. Клетки культивировали в полной ростовой среде DMEM/Ф12 с добавлением 10% сыворотки плода крупного рогатого скота. Активность имиглуцеразы, проникшей в клетки, оценивали спектрофотометрически по гидролизу искусственного субстрата 4-метилумбеллиферил- β -D-глюкопиранозида. **Результаты:** представлены данные сравнительной оценки интернализации рекомбинантной имиглуцеразы, действующего вещества препаратов Церезим® и Глуразим, перитонеальными макрофагами мыши и клетками фибробластов мыши линии L929. Показано, что активность препаратов в лизатах перитонеальных макрофагов сопоставима с их активностью в лизатах клеток фибробластов мыши линии L929, при этом активность разработанного препарата Глуразим независимо от типа клеток была в границах допустимого диапазона (80–125%), установленного для биоподобных препаратов. **Выводы:** экспериментально доказано, что фибробласты мыши линии L929 могут быть рекомендованы для оценки интернализации рекомбинантной имиглуцеразы.

Ключевые слова: рекомбинантная имиглуцераса; клетки-мишени; перитонеальные макрофаги; фибробласты мыши линии L929; интернализация

Для цитирования: Лягоскин ИВ, Пантюшенко МС, Стрижакова ОМ, Кудина НК, Прудникова ЕЮ, Чичканова ПВ, Аббасова СГ. Интернализация рекомбинантной имиглуцеразы в перитонеальные макрофаги мыши и фибробласты мыши линии L929. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(1):42–49. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-42-49>

Контактное лицо: Лягоскин Иван Владимирович; Lyagoskin@ibcgenerium.ru

Internalization of Recombinant Imiglucerase into Mouse Peritoneal Macrophages and L929 Mouse Fibroblasts

I. V. Lyagoskin*, M. S. Pantyushenko, O. M. Strizhakova, N. K. Kudina, E. Yu. Prudnikova, P. V. Chichkanova, S. G. Abbasova

International Biotechnology Center "GENERIUM",
14 Vladimirskaia St., Volginsky town, Petushinsky District,
Vladimir Oblast 601125, Russian Federation

Enzyme replacement therapy (ERT) is one of the most efficient treatments for lysosomal storage diseases. Type 1 Gaucher disease is caused by β -glucocerebrosidase enzyme deficiency, which may be compensated for by intravenous infusions of imiglucerase—a recombinant enzyme. Imiglucerase targets macrophages and enters these cells via interaction with mannose receptors on the cell membrane. Characterisation of internalization of enzymes by target cells is important in the context of the development of new medicines and production of existing ERT medicines. The peritoneal and alveolar macrophages, as well as macrophages of the spleen of small laboratory animals (rats and mice) are widely used in such studies. However, isolation of cells from animal sources raises ethical issues, and therefore continuous mammalian cell lines may offer an attractive alternative. **The aim of the**

study: to conduct comparative studies on the internalization of recombinant imiglucerase into mouse peritoneal macrophages and L929 mouse fibroblasts. **Materials and methods:** Cerezyme® batches 7HV0913, C6214H05, 7HV0888 (Genzyme Ltd., UK); Glurazim batches 020416, 011117, 021117 (LLC "IBC "Generium", Russia). We used peritoneal macrophages obtained from BALB/c mice and L929 mouse fibroblasts. The cells were cultured in DMEM/F12 complete growth medium with 10% fetal bovine serum. The activity of imiglucerase internalized into the cells was evaluated spectrophotometrically by hydrolysis of the artificial substrate—4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside. **Results:** the study compared internalization of recombinant imiglucerase (the active ingredient of Cerezyme® and Glurazim) by mouse peritoneal macrophages and L929 mouse fibroblasts. It was demonstrated that the medicines activity in the lysates of peritoneal macrophages is comparable with that in the lysates of L929 mouse fibroblasts. Regardless of the model system, the activity of Glurazim stayed within the acceptable range (80–125%) established for biosimilar products. **Conclusions:** the experiments proved that L929 mouse fibroblasts could be recommended for assessment of internalization of recombinant imiglucerase.

Key words: recombinant imiglucerase; target cells; peritoneal macrophages; L929 mouse fibroblasts; internalization

For citation: Lyagoskin IV, Pantyushenko MS, Strizhakova OM, Kudina NK, Prudnikova EYu, Chichkanova PV, Abbasova SG. Internalization of recombinant imiglucerase into mouse peritoneal macrophages and L929 mouse fibroblasts. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(1):42–49. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-42-49>

Corresponding author: Ivan V. Lyagoskin; Lyagoskin@ibcgenerium.ru

Болезнь Гоше (БГ, глюкозилцерамидный липидоз, код по МКБ 10: E75.2 Другие сфинголипидозы) — наследственное заболевание, является одной из самых распространенных лизосомных болезней накопления [1]. БГ характеризуется недостаточностью ферментативной активности β -глюкоцереброзидазы, что приводит к избыточному накоплению глюкоцереброзида в тканевых макрофагах, которые носят название «клетки Гоше». Клетки Гоше обычно обнаруживаются в печени, селезенке, костном мозге и иногда также в легких, почках и кишечнике. Наиболее частые осложнения БГ — костно-суставные поражения, которые являются наиболее частой причиной инвалидности и смертности при данной болезни [2].

В 1970-х годах был предпринят ряд попыток лечения БГ внутривенным введением фермента (фермент-заместительная терапия, ФЗТ). Однако вводимый фермент обладал ограниченной терапевтической ценностью, поскольку вводимая немодифицированная β -глюкоцереброзидаза человека, полученная из плаценты, плохо проникала в клетки-мишени путем интернализации через маннозный рецептор из-за ограниченного количества концевых остатков маннозы [3, 4]. Маннозный рецептор (MP, CD206 или MRC1) является трансмембранным гликопротеином, который принадлежит к семейству лектинов С-типа. Данный рецептор экспрессирован у большинства тканевых макрофагов, дендритных клеток (ДК) и некоторых лимфатических или печеночных эндотелиальных клеток [1]. Его внеклеточная часть содержит N-терминальный богатый цистеином (CR) домен, который с высокой аффинностью связывает маннозу и фукозу. Маннозный рецептор участвует в выведении гликопротеинов из кровотока, включая сульфатированные гликопептидные гормоны и гликопротеины, высвобождающиеся в результате патологических процессов [5, 6].

Рекомбинантная имиглуцераса в отличие от нативного фермента (β -глюкоцереброзидаза) для усиления фармакологического действия дополнительно обрабатывается гликозидазами (нейраминидазой, β -N-ацетилглюкозаминидазой и β -галактозидазой), в результате чего структура ее боковых углеводных цепей заканчивается остатками маннозы, а это, в свою очередь, обеспечивает эффективную интернализацию белка в макрофаги, другие клетки, несущие рецепторы маннозы, и проявление специфической ферментативной активности в пораженных клетках-мишенях [7–9]. Таким образом, терапевтический эффект препаратов на основе фермента ре-

комбинантной имиглуцеразы обеспечивается как за счет его ферментативной активности, так и за счет эффективности проникновения в пораженные клетки-мишени. Поэтому при разработке биоподобных препаратов имиглуцеразы очень важно оценивать интернализацию разрабатываемых ферментов в сравнении с референтным.

Оценку активности рекомбинантной имиглуцеразы с точки зрения проникновения ее в клетки, экспрессирующие рецепторы маннозы (CD206), изучают как на перитонеальных макрофагах мыши, так и на культурах клеток. Применение клеточной линии позволит не только минимизировать использование лабораторных животных в экспериментах, но и получать более воспроизводимые результаты ввиду более стандартизируемых свойств клеточных линий.

Цель работы — провести сравнительные исследования интернализации рекомбинантной имиглуцеразы в перитонеальные макрофаги мыши и фибробласты мыши линии L929.

Материалы и методы

Исследуемые образцы. Церезим®, серии 7HV0913, C6214H05, 7HV0888 (Джензайм Лтд., Великобритания); Глуразим, серии 020416, 011117, 021117 (ООО «МБЦ «Генериум», Россия).

Клетки. Перитонеальные макрофаги получали от мышей линии BALB/c. Фибробласты мыши L929, линия NCTC clone 929 (L cell, L-929, derivative of Strain L (ATCC® CCL-1™)).

Получение перитонеальных макрофагов мыши. Перитонеальные макрофаги получали от мышей линии BALB/c возраста 7–8 недель (НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН, Россия) путем промывания брюшной полости фосфатно-солевым буферным раствором, pH 7,2–7,6 (ФБР) («ЭКО-Сервис», Россия, кат. № В-60201). Содержание и уход за биологической тест-системой (мыши линии BALB/c) проводили в соответствии с нормами и правилами, указанными в «Политике работы с животными ООО «МБЦ «Генериум» и Руководстве по содержанию и использованию лабораторных животных¹. Исследование одобрено на заседании Комиссии по биоэтике ООО «МБЦ «Генериум».

Для снижения адгезии пробирку с суспензией перитонеальных клеток держали во льду. Клетки перитонеальной полости мыши осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 300 g. Осадок ресуспендировали в полной ростовой среде

¹ Белозерцева ИВ, Блинов ДВ, Красильщикова МС, ред. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Пер. с англ. Изд. 8-е. М.: ИРБИС; 2017.

DMEM/Ф12 (Sigma-Aldrich, США, кат. № D8900), содержащей 10% фетальной сыворотки плода крупного рогатого скота (HyClone®, США, кат. № SV30160.03), 1 мМ натрия пирувата (Lonza, Швейцария, кат. № BE13-115E), 1,2 г/л бикарбоната натрия (Sigma-Aldrich, США, кат. № S6297), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (ООО НПП «ПанЭко», Россия, кат. № А063). После подсчета клеток с помощью прибора Nucleocounter (NucleoCounter® System (Chemometec, Дания)) готовили суспензию с концентрацией 5×10^5 клеток/мл.

Культивирование и получение клеточной суспензии фибробластов мыши линии L929. Фибробласты мыши линии L929 культивировали во флаконах в полной ростовой среде DMEM/Ф12. После достижения монослоя клетки с поверхности культурального флакона «снимали» обработкой раствором трипсин/ЭДТА (Lonza, Швейцария, кат. № BE02-007E), далее готовили суспензию клеток в ростовой среде. После подсчета клеток с помощью прибора Nucleocounter готовили суспензию с концентрацией 5×10^5 клеток/мл.

Приготовление лизатов клеток и оценка специфической активности интернализированной рекомбинантной имиглюцеразы. В 96-луночный микропланшет с V-образным дном (Corning Incorporated, США, кат. № 3894) вносили по 100 мкл суспензии клеток (5×10^4 клеток в лунку). Клетки осаждали и в лунки вносили по 50 мкл исследуемых препаратов в последовательных разведениях с шагом 1,2 в ростовой среде DMEM/Ф12 от 10 000 до 3349 нМ, все разведения вносили в трипликатах.

Для каждого препарата готовили дополнительные микропланшеты с клетками, которые обрабатывали ледяным глициновым буферным раствором состава (%): NaCl — 0,8, KCl — 0,038, MgCl₂ — 0,01, CaCl₂ — 0,01, глицин — 0,7, pH 3,0 [10].

Препараты с клетками инкубировали в CO₂-инкубаторе MCO-20AIC (Sanyo, Япония) при (37,0 ± 0,2) °C в течение 3 ч.

После инкубации клетки 5 раз промывали холодным ФБР (pH 7,2–7,6), осадок клеток ресуспендировали в 200 мкл 1% раствора тритона X-100 (Applichem Panreac, США, кат. № 9002-93-1) и выдерживали в течение 30 мин при (37,0 ± 0,2) °C. Дополнительно клетки подвергали этапу лизиса путем трехкратной заморозки — разморозки суспензии. Уровень лизиса клеток контролировали микроскопией (микроскоп биомедицинский Nikon ECLIPSE Ti-s, Япония). Полученные лизаты осветляли центрифугированием при 350 g в течение 10 мин, супернатант (по 20 мкл) переносили в заранее подготовленные 96-луночные микропланшеты с плоским дном (Corning Incorporated, США, кат. № 3599) и добавляли субстрат — 4-метилумбеллиферил-β-D-глюкопиранозид (Applichem Panreac, США, кат. № A1273,0500), который при взаимодействии с имиглюцеразой образовывал флуоресцирующий продукт — 4-метилумбеллиферон. В некоторых случаях приготовленные клеточные лизаты замораживали и хранили при минус 20 °C до проведения анализа.

Сигнал флуоресценции измеряли с помощью спектрофотометра SpectraMax® M3 (Molecular Devices, США) при длине волны возбуждения — 365 нм и длине волны эмиссии — 440 нм.

Активность интернализированного фермента оценивали как разницу значений интенсивности сигнала между необработанными и обработанными глициновым буферным раствором клетками в лунках.

Учет и обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения Excel и GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Incorporated, США), аппроксимируя полученные дан-

ные 4-параметрической логистической функцией. Активность препаратов определяли по значению EC₅₀ (полумаксимальная эффективная концентрация, специфическая активность), которую рассчитывали в автоматическом режиме. Относительную специфическую активность (A₁, %) каждой серии препарата Глуразим рассчитывали по формуле (1):

$$A_1 = \frac{EC_{50}(\text{серия Церезим}^{\circledast} \text{ стандарт})}{EC_{50}(\text{серия Глуразим})} \cdot 100, \quad (1)$$

где EC₅₀ (серия Церезим® стандарт) — полумаксимальная эффективная концентрация (специфическая активность) серии препарата Церезим®, выбранного в качестве стандартного;

EC₅₀ (серия Глуразим) — полумаксимальная эффективная концентрация (специфическая активность) серии препарата Глуразим.

Относительную специфическую активность (A₂, %) каждой серии препарата Церезим® рассчитывали по формуле (2):

$$A_2 = \frac{EC_{50}(\text{серия Церезим}^{\circledast} \text{ стандарт})}{EC_{50}(\text{серия Церезим}^{\circledast})} \cdot 100, \quad (2)$$

где EC₅₀ (серия Церезим® стандарт) — полумаксимальная эффективная концентрация (специфическая активность) серии препарата Церезим®, выбранного в качестве стандартного;

EC₅₀ (серия Церезим®) — полумаксимальная эффективная концентрация (специфическая активность) серии препарата Церезим®.

Расчет для каждой серии препарата Глуразим проводили относительно каждой из серий референтного препарата (Церезим®), а расчет для серий референтного препарата — относительно серии референтного препарата, произвольно выбранной в качестве стандартного препарата.

Критериями приемлемости результатов теста были: 1) коэффициент вариации (% CV) для каждой тестируемой концентрации серии Церезим® и испытуемого препарата не должен был превышать 15%; 2) коэффициент аппроксимации (R²) 4-параметрической функции должен был быть не менее 0,95.

Оценка специфичности интернализации рекомбинантной имиглюцеразы. В отдельные лунки планшета с клетками вносили препарат в насыщающей концентрации 5000 нМ и раствор маннана (Sigma-Aldrich, США, кат. № M7504-250MG) в конечной концентрации 2,5 мг/мл для оценки специфичности интернализации белка через маннозный рецептор. Дальнейшие манипуляции проводили, как описано в подразделе Приготовление лизатов клеток и оценка специфической активности интернализированной рекомбинантной имиглюцеразы.

Статистическая обработка данных. Массив данных обрабатывали с применением программы GraphPad Prism 6.0 по рекомендациям, описанным в фармакопее США², а также используя непарный *t*-критерий Стьюдента³.

Для оценки биоподобия между двумя продуктами использовали интервал 80–125% для значений относительной специфической активности (relative potency) [11, 12].

Результаты и обсуждение

На первом этапе испытуемые препараты Глуразим и Церезим® были протестированы на способность проникать в перитонеальные макрофаги мыши, поскольку основными клетками-мишенями при БГ являются макрофаги. Результаты анализа интернализации рекомбинантной имиглюцеразы представлены в таблицах 1, 2.

² Chapter <1034> Analysis of Biological Assays. USP 35–NF 30; 2012.

³ GraphPad Prism User Guide.

Таблица 1. Показатели специфической активности (EC_{50}) для референтного препарата Церезим® после интернализации в клетки перитонеальных макрофагов, полученных от мышей линии BALB/c

Table 1. Specific activity (EC_{50}) of the reference product Cerezyme® after internalization in the cells of peritoneal macrophages obtained from BALB/c mice

Серия препарата Церезим® Cerezyme® batch	EC_{50} , нМ EC_{50} , nM		
	Повторность Replicates		Среднее значение ± стандартное отклонение Mean ± standard deviation
	1	2	
7HV0913	8539	8606	8573 ± 47
C6214H05	10879	8178	9529 ± 1910
7HV0888	8056	8096	8076 ± 28
			8726 ± 1080

Таблица 2. Показатели специфической активности (EC_{50}) для препарата Глуразим после интернализации в клетки перитонеальных макрофагов, полученных от мышей линии BALB/c

Table 2. Specific activity (EC_{50}) of Glurazim after internalization in the cells of peritoneal macrophages obtained from BALB/c mice

Серия препарата Глуразим Glurazim batch	EC_{50} , нМ EC_{50} , nM		
	Повторность Replicates		
	1	2	3
020416	9447	10 630	8270
011117	8654	11 417	9151
021117	8655	8954	8961
			9449 ± 1180
			9741 ± 1473
			8857 ± 175
			9349 ± 1025

Таблица 3. Показатели относительной специфической активности серий препаратов Церезим® и Глуразим после интернализации в клетки перитонеальных макрофагов, полученных от мышей линии BALB/c

Table 3. Relative potencies of Cerezyme® and Glurazim batches after internalization in the cells of peritoneal macrophages obtained from BALB/c mice

Серия препарата Глуразим Glurazim batch	Относительная специфическая активность, % Relative potency, %		
	Серия препарата Церезим® Cerezyme® batches		
	7HV0913*	C6214H05*	7HV0888*
020416	90	102	97
011117	98	95	88
021117	99	121	90
			96,3 ± 6,0
			93,7 ± 5,1
			103,3 ± 15,9

* Специфическая активность серии препарата, используемая как референтная в данном исследовании, принята за 100%.

* The specific activity of the product batch used as the reference in this study is taken as 100%.

Таблица 4. Показатели относительной специфической активности для референтного препарата Церезим® после интернализации в клетки перитонеальных макрофагов, полученных от мышей линии BALB/c

Table 4. Relative potency of the reference product Cerezyme® after internalization into cells of peritoneal macrophages obtained from BALB/c mice

Серия препарата Церезим® Cerezyme® batch	Относительная специфическая активность, % Relative potency, %		
	Серия препарата Церезим® Cerezyme® batches		
	7HV0913*	C6214H05*	7HV0888*
7HV0913	100	95	94
C6214H05	90	100	99
7HV0888	98	101	100
			96,3 ± 3,2
			96,3 ± 5,5
			99,7 ± 1,5

* Специфическая активность серии препарата, используемая как референтная в данном исследовании, принята за 100%.

* The specific activity of the product batch used as the reference in this study is taken as 100%.

Специфическая активность изучаемых препаратов в лизатах макрофагов была сопоставима. Среднее значение EC_{50} для серий референтного препарата Церезим® составило 8726 ± 1080 нМ, для серий препарата Глуразим — 9349 ± 1025 нМ. С помощью непарного *t*-критерия Стьюдента значимых различий не выявлено ($p = 0,2789$), что свидетельствует о сопоставимой эффективности их проникновения в клетки (рис. 1).

Относительная специфическая активность трех серий препарата Глуразим, вычисленная относительно каждой из серий Церезима®, укладывалась в диапазон 80–125% и варьировала

от 93,7 до 103,3%. Относительная специфическая активность серий референтного препарата Церезим®, рассчитанная относительно произвольно назначенной серии Церезим® в качестве стандарта, варьировала от 96,3 до 99,7%. Данные представлены в таблицах 3, 4.

Известно, что интернализация фермента имиглюцеразы может быть снижена при добавлении маннана в культуральную среду, который конкурирует с препаратом за связывание с маннозными рецепторами [10]. Для подтверждения биоподобия референтного и разработанного препаратов

необходимо было показать, что интернализация изучаемых препаратов в одинаковой степени снижается в присутствии маннана.

При внесении препаратов Глуразим и Церезим® в насыщающую концентрацию 5000 нМ в ростовую среду, содержащую маннан в концентрации 2,5 мг/мл, уровень интернализованного рекомбинантного фермента как для Глуразима, так и для Церезима® снижался в среднем на 25% (рис. 2).

Таким образом, добавление маннана в культуральную среду к культуре перитонеальных макрофагов мыши в одинаковой степени снижает интернализацию препаратов Глуразим и Церезим®, что доказывает сходный механизм их проникновения.

В исследованиях интернализации многими авторами применяются различные клеточные линии, несущие на своей поверхности маннозные рецепторы (CD206), например клетки линии U937 (гистиоцитарная лимфома человека), NR8383 (альвеолярные макрофаги крысы) [10, 13, 14]. В представленной работе была испытана клеточная линия фибробластов мыши L929.

Результаты анализа интернализации рекомбинантной имиглоуцеразы в клетки фибробластов мыши линии L929 представлены в таблицах 5, 6.

Относительная специфическая активность трех серий препарата Глуразим, вычисленная относительно каждой из серий Церезима®, варьировала от 101 до 112%, при этом укладывалась в диапазон 80–125%. Относительная специфическая активность серий референтного препарата Церезим® варьировала от 95,7 до 103,7% (табл. 7, 8). Полученные данные эффективности проникновения препаратов в клетки фибробластов мыши линии L929 хорошо согласуются с данными, полученными в экспериментах с перитонеальными макрофагами мышей как для средних значений EC_{50} , так и для показателей относительной специфической активности.

Как видно из данных, представленных в таблицах 5 и 6, значения специфической ферментативной активности сравниваемых препаратов в лизатах клеток фибробластов мыши линии L929 были сопоставимы — 8049 ± 424 нМ для референтного препарата Церезим® и 7179 ± 476 нМ для препарата

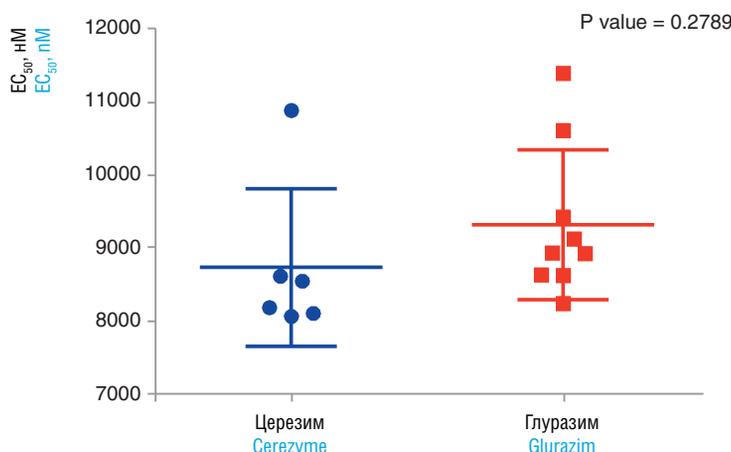


Рис. 1. Значения специфической активности для серий препаратов Церезим® и Глуразим после интернализации в клетки перитонеальных макрофагов мышей линии BALB/c и оценка значимости различий между препаратами по непарному *t*-критерию Стьюдента.

Fig. 1. Specific activities of Cerezyme® and Glurazim batches after internalization into the cells of peritoneal macrophages from BALB/c mice, and evaluation of the significance of the differences between the products using the unpaired Student's *t*-test.

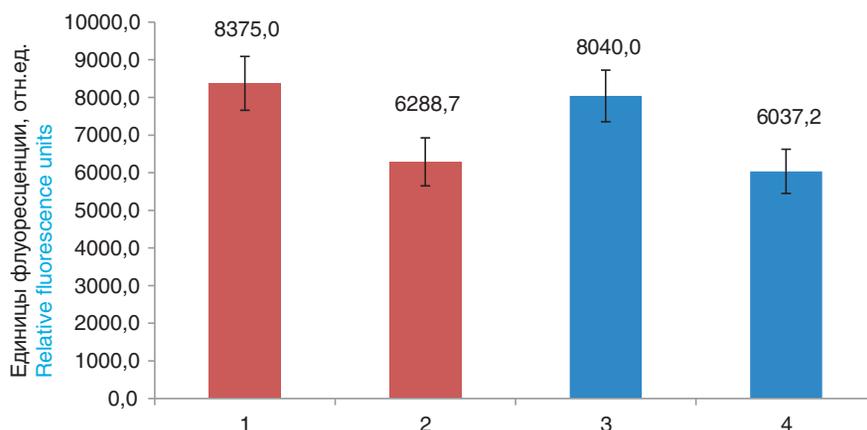


Рис. 2. Значения флуоресценции в лизатах клеток перитонеальных макрофагов мыши BALB/c после инкубации клеток с препаратами Глуразим и Церезим® в присутствии и отсутствии маннана. (1) Глуразим без маннана; (2) Глуразим с маннаном (2,5 мг/мл); (3) Церезим без маннана; (4) Церезим с маннаном (2,5 мг/мл).

Fig. 2. Fluorescence in the lysates of peritoneal macrophages obtained from BALB/c mice after incubation of the cells with Glurazim and Cerezyme® with or without mannan. (1) Glurazim without mannan; (2) Glurazim with mannan (2.5 mg/mL); (3) Cerezyme without mannan; (4) Cerezyme with mannan (2.5 mg/mL).

Таблица 5. Показатели специфической активности (EC_{50}) для референтного препарата Церезим® после интернализации в клетки фибробластов мыши линии L929

Table 5. Specific activity (EC_{50}) of the reference product Cerezyme® after internalization into L929 mouse fibroblasts

Серия препарата Церезим® Cerezyme® batch	EC_{50} , нМ EC_{50} , nM		
	Повторность Replicates		Среднее значение ± стандартное отклонение Mean ± standard deviation
	1	2	
7HV0913	7497	8061	7779 ± 399
C6214H05	7847	8273	8060 ± 301
7HV0888	7880	8737	8309 ± 606
			8049 ± 424

Таблица 6. Показатели специфической активности (EC_{50}) для препарата Глуразим после интернализации в клетки фибробластов мыши линии L929

Table 6. Specific activity (EC_{50}) of Glurazim after internalization into L929 mouse fibroblasts

Серия препарата Глуразим Glurazim batch	EC_{50} , нМ EC_{50} , nM			
	Повторность Replicates			Среднее значение ± стандартное отклонение Mean ± standard deviation
	1	2	3	
020416	7199	8036	7880	7705 ± 445
011117	7102	6855	6800	6719 ± 161
021117	7195	6797	6751	6914 ± 244
				7179 ± 476

Таблица 7. Показатели относительной специфической активности серий препаратов Церезим® и Глуразим после интернализации в клетки фибробластов мыши линии L929

Table 7. Relative potencies of Cerezyme® and Glurazim batches after internalization into L929 mouse fibroblasts

Серия препарата Глуразим Glurazim batch	Относительная специфическая активность, % Relative potency, %			Среднее значение ± стандартное отклонение Mean ± standard deviation
	Серия препарата Церезим® Cerezyme® batches			
	7HV0913*	C6214H05*	7HV0888*	
020416	104	98	102	101,0 ± 3,1
011117	106	114	116	112,0 ± 5,3
021117	104	115	117	112,0 ± 7,0

* Специфическая активность серии препарата, используемая как референтная в данном исследовании, принята за 100%.

* The specific activity of the product batch used as the reference in this study is taken as 100%.

Таблица 8. Показатели относительной специфической активности для референтного препарата Церезим® после интернализации в клетки фибробластов мыши линии L929

Table 8. Relative potency of the reference product Cerezyme® after internalization into L929 mouse fibroblasts

Серия препарата Церезим® Cerezyme® batch	Относительная специфическая активность, % Relative potency, %			Среднее значение ± стандартное отклонение Mean ± standard deviation
	Серия препарата Церезим® Cerezyme® batches			
	7HV0913*	C6214H05*	7HV0888*	
7HV0913	100	103	108	103,7 ± 4,0
C6214H05	97	100	106	101,0 ± 4,6
7HV0888	92	95	100	95,7 ± 4,0

* Специфическая активность серии препарата, используемая как референтная в данном исследовании, принята за 100%.

* The specific activity of the product batch used as the reference in this study is taken as 100%.

Глуразим. С помощью непарного *t*-критерия Стьюдента выявлены статистически значимые различия ($p = 0,0031$), не превышающие 12% (рис. 3).

Оценивали влияние маннана на интернализацию рекомбинантного фермента в клетки фибробластов мыши линии L929. Установлено, что при концентрации препаратов Глуразим и Церезим® 5000 нМ и маннана в ростовой среде 2,5 мг/мл интернализация фермента снижалась в среднем на 51% (рис. 4). Результаты согласуются с данными, полученными при применении перитонеальных макрофагов, и подтверждают механизм проникновения фермента через маннозный рецептор.

Ранее нами было показано, что клеточная линия L929 экспрессирует и маннозо-6-фосфатный рецептор (M6P) (дан-

ные не представлены). Однако добавление натриевой соли D-маннозы-6-фосфата к культуральной среде не влияло на интернализацию рекомбинантной имиглюцеразы, что подтверждает механизм интернализации через маннозный рецептор и согласуется с результатами, полученными В. Brumshstein с соавт. [8].

Закключение

Проведенное исследование подтвердило биоподобие препарата Глуразим в отношении референтного препарата Церезим® на двух типах клеток. При использовании перитонеальных макрофагов мыши значения специфической активности составили по трем сериям для препарата Церезим® 8726 ±

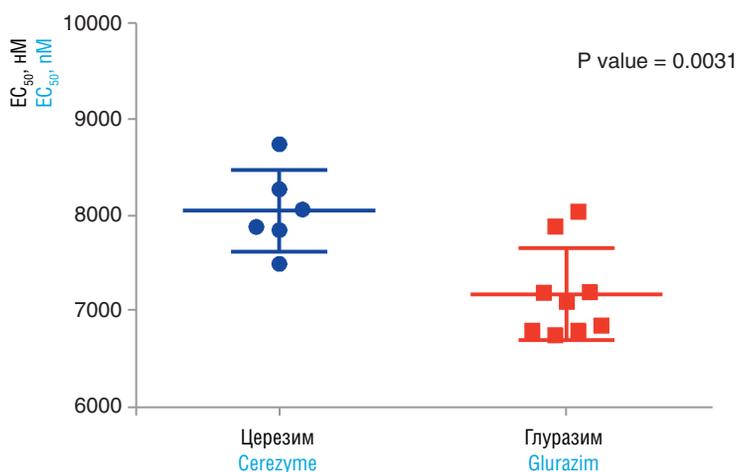


Рис. 3. Значения специфической активности для серий препаратов Церезим® и Глуразим после интернализации в клетки фибробластов мыши линии L929 и оценка значимости различий между препаратами по непарному *t*-критерию Стьюдента.
Fig. 3. Specific activities of Cerezyme® and Glurazim batches after internalization into L929 mouse fibroblasts, and evaluation of the significance of the differences between the products using the unpaired Student's *t*-test.

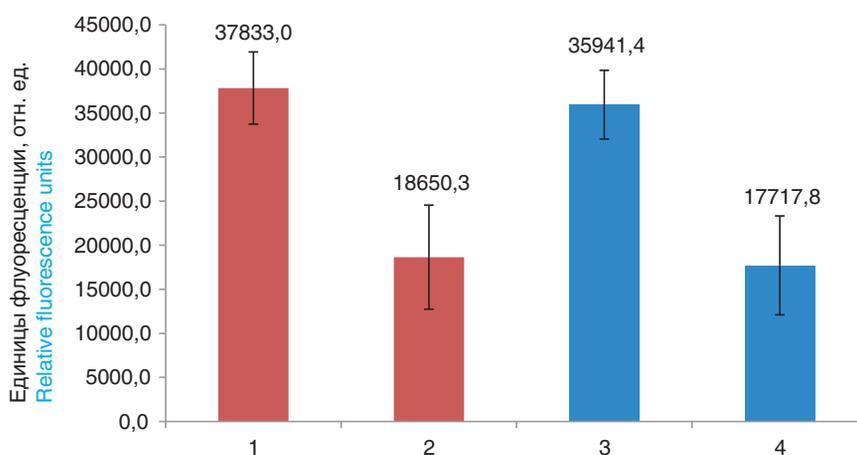


Рис. 4. Значения флуоресценции в лизатах клеток фибробластов мыши линии L929 после инкубации клеток с препаратами Глуразим и Церезим® в присутствии и отсутствии маннана. (1) Глуразим без маннана; (2) Глуразим с маннаном (2,5 мг/мл); (3) Церезим без маннана; (4) Церезим с маннаном (2,5 мг/мл).
Fig. 4. Fluorescence in the lysates of L929 mouse fibroblasts after incubation of the cells with Glurazim and Cerezyme® with or without mannan. (1) Glurazim without mannan; (2) Glurazim with mannan (2.5 mg/mL); (3) Cerezyme without mannan; (4) Cerezyme with mannan (2.5 mg/mL).

1080 нМ и для препарата Глуразим 9349 ± 1025 нМ, а при применении фибробластов мыши линии L929 — 8049 ± 424 и 7179 ± 476 нМ соответственно.

Значения специфической активности для препарата Глуразим не выходят за пределы допустимого диапазона (80–125%).

Экспериментально показано, что имиглюцераза проникает в перитонеальные макрофаги мыши и в клетки фибробластов мыши линии L929 по сходному механизму — путем взаимодействия с маннозным рецептором (CD206) и ее последующей интернализацией, а эффективность этого процесса, определенная по абсолютным значениям ферментативной активности в лизатах клеток, также сопоставима, что позволяет рекомендовать фибробласты мыши линии L929 для изучения CD206-опосредованной интернализации молекул. Применение клеточной линии позволит не только минимизировать использование лабораторных животных в экспериментах, но и получать более воспроизводимые результаты ввиду более стандартизируемых свойств клеточных линий.

Вклад авторов. *И. В. Лягоскин* — идея, планирование исследования, выполнение отдельных этапов экспериментальных работ с культурой перитонеальных макрофагов и фибробластами мыши линии L929, интерпретация результатов исследования, написание, доработка текста; *М. С. Пантюшенко* — выполнение отдельных этапов экспериментальных работ по оценке ферментативной активности интернализованного фермента, окончательное утверждение версии рукописи для публикации; *О. М. Стрижакова* — выполнение отдельных этапов экспериментальных работ по получению лизатов клеток; *Н. К. Кудина* — выполнение отдельных этапов экспериментальных работ по наработке фибробластов мыши линии L929; *Е. Ю. Прудникова* — выполнение работ по статистической обработке данных, формализация списка литературы, работа с графическим материалом; *П. В. Чичканова* — выполнение отдельных этапов экспериментальных работ с биологической тест-системой, получение перитонеальных макрофагов; *С. Г. Аббасова* — сбор и систематизация данных, доработка текста.

Authors' contributions. *Ivan V. Lyagoskin*—research idea and planning, implementation of individual stages of experimental

work with the peritoneal macrophage culture and L929 mouse fibroblasts, interpretation of research results, writing, revising the text; **Marina S. Pantyushenko**—implementation of certain stages of experimental work involving the assessment of the enzymatic activity of the internalized enzyme, the final approval of the manuscript version for publication; **Olga M. Strizhakova**—implementation of individual stages of experimental work, namely obtaining cell lysates; **Natalya K. Kudina**—implementation of individual stages of experimental work, namely production of L929 mouse fibroblasts; **Elena Yu. Prudnikova**—statistical data processing, compilation of the list of references, preparation of graphic material; **Polina V. Chichkanova**—implementation of individual stages of experimental work with the biological test system, obtaining peritoneal macrophages; **Svetlana G. Abbasova**—data collection and systematisation, revising the text.

Благодарности. Авторы выражают благодарность руководству ООО «МБЦ «Генериум» в лице генерального директора Р. А. Хамитова.

Acknowledgements. The authors are grateful to the management of LLC “IBC “Generium” and the General Director R. A. Khamitov, in particular.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература/References

1. Zimran A. How I treat Gaucher disease. *Blood*. 2011;118(6):1463–71. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-308890>
2. Dekker N, van Dussen L, Hollak CE, Overkleeft H, Scheij S, Ghauharali K, et al. Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response. *Blood*. 2011;118(16):118–27. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-352971>
3. Sato Y, Beutler E. Binding, internalization, and degradation of mannose-terminated glucocerebrosidase by macrophages. *J Clin Invest*. 1993;91(5):1909–17. <https://doi.org/10.1172/JCI116409>
4. Friedman B, Vaddi K, Preston C, Mahon E, Cataldo JR, McPherson JM. A comparison of the pharmacological properties of carbohydrate remodeled recombinant and placental-derived beta-glucocerebrosidase: implications for clinical efficacy in treatment of Gaucher disease. *Blood*. 1999;93(9):2807–16.
5. Novo JB, Morganti L, Moro AM, Paes Leme AF, Serrano SM, Raw I, Ho PL. Generation of a Chinese hamster ovary cell line producing recombinant human glucocerebrosidase. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:875383. <http://doi.org/10.1155/2012/875383>
6. Zhu Y, Li X, Schuchman EH, Desnick RJ, Cheng SH. Dexamethasone-mediated up-regulation of the mannose receptor improves the delivery of recombinant glucocerebrosidase to Gaucher macrophages. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;308(2):705–11. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.060236>
7. Simmons BM, Stahl PD, Russell JH. Mannose receptor-mediated uptake of ricin toxin and ricin A chain by macrophages. Multiple intracellular pathways for a chain translocation. *J Biol Chem*. 1986;261(17):7912–20.
8. Brumshtein B, Salinas P, Peterson B, Chan V, Silman I, Sussman JL, et al. Characterization of gene-activated human acid- β -glucosidase: crystal structure, glycan composition, and internalization into macrophages. *Glycobiology*. 2010;20(1):24–32. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp138>
9. Shaaltiel Y, Bartfeld D, Hashmueli S, Baum G, Brill-Almon E, Galili G, et al. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnol J*. 2007;5(5):579–90. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00263.x>
10. Tekoah Y, Tzaban S, Kizhner T, Hainrichson M, Gantman A, Golemb M, et al. Glycosylation and functionality of recombinant β -glucocerebrosidase from various production systems. *Biosci Rep*. 2013;33(5):e00071. <https://doi.org/10.1042/BSR20130081>
11. Carballo-Uicab G, Linares-Trejo JE, Mellado-Sánchez G, López-Morales CA, Velasco-Velázquez M, Pavón L, et al. Validation of a cell proliferation assay to assess the potency of a dialyzable leukocyte extract intended for batch release. *Molecules*. 2019;24(19):E3426. <https://doi.org/10.3390/molecules24193426>
12. Mejía-Calvo I, Muñoz-García L, Jiménez-Urbe A, Camacho-Sandoval R, González-González E, Mellado-Sánchez G, et al. Validation of a cell-based colorimetric reporter gene assay for the evaluation of Type I Interferons. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2019;22:e00331. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00331>
13. Azad AK, Rajaram MVS, Schlesinger LS. Exploitation of the macrophage mannose receptor (CD206) in infectious disease diagnostics and therapeutics. *J Cytol Mol Biol*. 2014;10(1):1000003. <https://doi.org/10.13188/2325-4653.1000003>
14. Van Patten SM, Hughes H, Huff MR, Piepenhagen PA, Waire J, Qiu H, et al. Effect of mannose chain length on targeting of glucocerebrosidase for enzyme replacement therapy of Gaucher disease. *Glycobiology*. 2007;17(5):467–78. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm008>

Об авторах / Authors

Лягоскин Иван Владимирович, канд. биол. наук. *Ivan V. Lyagoskin*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9058-1106>

Пантюшенко Марина Семеновна, канд. биол. наук. *Marina S. Pantyushenko*, Cand. Sci. (Biol.)

Стрижакова Ольга Михайловна, канд. вет. наук. *Olga M. Strizhakova*, Cand. Sci. (Vet.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0023-0028>

Кудина Наталья Константиновна. *Natalya K. Kudina*

Прудникова Елена Юрьевна, канд. вет. наук. *Elena Yu. Prudnikova*, Cand. Sci. (Vet.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-7983-5312>

Чичканова Полина Владимировна. *Polina V. Chichkanova*

Аббасова Светлана Георгиевна, д-р биол. наук. *Svetlana G. Abbasova*, Dr. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-5841-7587>

Поступила 04.12.2019

После доработки 27.01.2020

Принята к публикации 14.02.2020

Received 4 December 2019

Revised 27 January 2020

Accepted 14 February 2020