

УДК 602.6:612

И.Н. САВИНОВА¹, Н.В. ЛОБАНОВА^{1,*}, Н.Н. БЫКОВА¹, Ю.В. ФИНОГЕЕВА¹, Л.И. СТАРОДУБЦЕВА¹,
А.А. КЛИШИН¹, А.А. НУРБАКОВ¹, Р.Р. ШУКУРОВ¹, Ю.А. СЕРЕГИН²

¹Общество с ограниченной ответственностью «Фармапарк», Москва, 117246

²ФГУП Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, 117545

e-mail: natalya.lobanova@pharmapark.ru

Эффективность жирных кислот, N-ацетил-D-маннозамина и N-ацетилнейраминовой кислоты для изменения профиля сиалирования рекомбинантного дарбэпоэтина-альфа в культуре клеток *CHO*

Осуществлен подбор комбинации культуральной среды и подпитки, обеспечивающей высокий выход целевых гликозилированных форм рекомбинантного дарбэпоэтина-альфа, производимого культурой клеток *CHO*. Исследовано влияние различных веществ — предшественников гликанов в реакциях гликозилирования — на выход высокосиалированных форм рекомбинантного дарбэпоэтина-альфа. Показано, что наиболее эффективным для повышения концентрации высокосиалированных форм данного белка в культуральной жидкости является использование 20 мМ N-ацетил-D-маннозамина.

Ключевые слова: гликозилирование, дарбэпоэтин-альфа, жирные кислоты, клетки *CHO*, сиалирование.

Дарбэпоэтин-альфа — искусственный аналог эритропоэтина человека, обладающий повышенным уровнем гликозилирования [1]. Данный белок содержит один O-связанный и пять N-связанных гликанов, которые могут содержать до 2 и 4 остатков сиаловых кислот, соответственно. Таким образом, молекула дарбэпоэтина (ДЭПО) может включать до 22 остатков сиаловых кислот, во многом определяющих ее свойства. В первую очередь, это касается времени полувыведения ДЭПО,

равного 25,3 ч, в отличие от 8,5 ч для эритропоэтина [2].

ДЭПО является высоко гетерогенным по посттрансляционным модификациям белком. Известно более 20 гликозилированных форм данного белка, различающихся по числу ветвей и содержанию в них остатков моносахаридов. Гликановые ветви могут содержать различное количество остатков концевых сиаловых кислот, а также разные модификации последних, ацетилированные и

Савинова Ирина Николаевна, Лобанова Наталья Валентиновна, Быкова Наталья Николаевна, Финогеева Юлия Владимировна, Стародубцева Любовь Ильинична, Клишин Анатолий Анатольевич, Нурбаков Альфред Анасович, Шукуров Рахим Рахманкулович, Серегин Юрий Александрович.

Список сокращений: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ДФ — долихол-фосфат, ДЭПО — дарбэпоэтин-альфа; КЖ — культуральная жидкость; ИЭФ — изоэлектрическое фокусирование; ТФУ — трифторуксусная кислота; УДФ — уридин-5'-дифосфат, ЦМФ — цитидин-5'-монофосфат.

* Автор для переписки.

окисленные [3]. Сочетание модификаций обеспечивает образование более 40 изоформ ДЭПО, различающихся по массе в диапазоне от 35,8 до 38,0 кДа [4]. Возможно, дальнейшее увеличение разрешающей способности аналитических методов позволит обнаруживать еще большую гетерогенность гликоформ ДЭПО.

В настоящее время полагают, что именно содержание сиаловых кислот является основным фактором, определяющим время полувыведения ДЭПО и его биологическую активность *in vivo* [2]. Это связано с тем, что сиаловые кислоты экранируют терминальный остаток галактозы на гликановых ветвях от взаимодействия с рецептором асиалогликопротеинов печени, предотвращая последующее выведение ДЭПО из кровотока [5]. Таким образом, именно количество остатков сиаловых кислот должно контролироваться в первую очередь при производстве данного белка. Степень сиалирования влияет на заряд и изоэлектрическую точку белка, поэтому для ее определения оптимальными являются аналитические методы, основанные на разделении по заряду, такие как изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) и капиллярный электрофорез.

Для того, чтобы рекомбинантный ДЭПО имел состав гликанов и профиль сиалирования, соответствующие таковому в человеческом организме, в биотехнологическом производстве широко применяют линии клеток млекопитающих. Так, оригинальный препарат на основе ДЭПО — Аранесп — производится с применением линии клеток яичников китайского хомячка (*CHO*) [1]. Данная клеточная линия в суспензионной форме является предпочтительной для производства всех современных биофармацевтических препаратов.

Однако даже для клеток *CHO* достижение такого высокого уровня сиалирования, каким характеризуется ДЭПО, является непростой задачей. В пользу этого утверждения косвенно свидетельствуют данные о том, что при изменении технологии производства ДЭПО компанией Amgen с использованием суспензионных клеток *CHO* профиль изоформ данного белка также существенно изменился [6]. В частности, обновление технологии культивирования привело к уменьшению концентрации наиболее кислой изоформы белка, содержащей наибольшее число остатков сиаловых кислот, на что указывают данные капиллярного электрофореза. К подобным отклонениям в настоящее время приковано все большее внимание регулирующих органов, поэтому при разработке дженериков необходимо добиваться их максимального соответствия оригинальным препаратам [7].

В литературе описано несколько способов воздействия на профиль гликозилирования и сиалирования рекомбинантных белков, продуцируемых клетками *CHO*. Данные способы основаны на предположении, что клеточный аппарат неспособен осуществлять полноценное гликозилирование рекомбинантных белков, производимых в больших количествах [8]. Этот факт обусловлен нехваткой как ферментов, участвующих в сборке и транспорте гликанов, а также присоединении их к полипептидной цепи, так и основных субстратов реакций гликозилирования, в основном соединений моносахаридов и нуклеозидов. Соответственно существуют две основные стратегии устранения узких мест процессов гликозилирования в клетках: гиперэкспрессия недостающих ферментов [9] и добавление ключевых субстратов в питательную среду [8].

Среди описанных в литературе наиболее эффективных добавок, влияющих на состав гликоформ белка, преобладают моносахариды и нуклеозиды. В частности, при добавлении в КЖ смеси, содержащей 5 мМ галактозу, 1 мМ уридин и 2 мкМ хлорид марганца, существенно повышалось содержание концевых остатков галактозы в моноклональных антителах [10]. Добавление 20 мМ N-ацетил-D-маннозамина, предшественника N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты, положительно влияло на профиль сиалирования интерферона-гамма [11]. В другом исследовании при введении смеси 10 мМ глюкозамина и 2 мМ уридина, как и 20 мМ N-ацетилманнозамина, резко повышался спектр внутриклеточных субстратов реакций гликозилирования, что, однако, не приводило к значимому повышению сиалирования целевого белка TIMP-1 [12]. Кроме того, внесение смеси глюкозамина и уридина вызывало увеличение числа антенн гликанов. В проведенном в нашей лаборатории исследовании использование комбинации 10 мМ галактозы и 2 мМ уридина приводило к росту содержания гликозилированных форм рекомбинантного интерферона бета-1а [13]. Таким образом, использование добавок на основе моносахаридов и их производных может быть эффективным для модификации профиля гликозилирования, если данные вещества являются лимитирующими в реакциях синтеза гликанов.

Ферментативные реакции, в ходе которых происходит преобразование глюкозы и нуклеозидов непосредственно в субстраты реакций гликозилирования, являются частью гексозаминового пути утилизации глюкозы [14]. Среди промежуточных веществ данного пути особого внимания заслуживают те, которые легко преобразуются в

целевые субстраты и при этом имеют разумную стоимость (табл. 1).

Кроме двух основных подходов к модификации профиля гликозилирования, указанных выше, существует еще один, основанный на ингибировании внутриклеточных гликозидаз. Имеются данные о том, что гликаны могут подвергаться деградации гликозидазами, которые попадают в КЖ из мертвых клеток [15, 16], и качество производимых гликопротеинов может снижаться в результате гибели клеток [17]. Следует отметить, что деградация рекомбинантного белка протеазами и гликозидазами из мертвых клеток и ненадлежащее качество белка, синтезируемого гибнущей клеткой — оба эти фактора важны лишь при низкой жизнеспособности клеток; при доле живых клеток выше 80 — 90% их вклад минимален.

Анализ перечисленных выше подходов к оптимизации гликозилирования позволяет заключить, что гиперэкспрессия гликозилирующих ферментов — задача, превосходящая по сложности и трудоемкости разработку клеточной линии. Поэтому для решения проблемы эффективной продукции ДЭПО в клетках *CHO* нами выбран второй подход, основанный на добавлении в питательную среду ключевых субстратов данных ферментов, а также их предшественников и производных.

Целью данного исследования являлся подбор добавок, наиболее эффективно повышающих выход высокосиализированных форм рекомбинантного ДЭПО, продуцируемого суспензионной культурой клеток *CHO*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Клоны-продуценты ДЭПО были получены методом введения генетической конструкции,

содержащей синтетический ген ДЭПО с оптимизированным кодонным составом под контролем промотора CMVenh/tEF1 и два S/MAR-элемента, в клетки суспензионной линии *CHO-S* (Invitrogen, США). Методом предельных разведений был отобран клон, обладающий лучшими ростовыми характеристиками, продуктивностью (10—15 мг/л/сут) и стабильностью экспрессии.

Культивирование в малом объеме осуществляли в колбах Эрленмейера емкостью 125 мл (Corning, США) на шейкере-CO₂-инкубаторе Multitron Cell (Infors, Швейцария) с частотой вращения 125 об/мин в атмосфере 5%-ного углекислого газа при температуре 37° и влажности 75%. Клетки пересеивали каждые 2—3 сут до получения суспензии плотностью 0,3 · 10⁶ кл/мл. Использовали бессывороточные питательные среды Power CHO-2 CD (Lonza, Швейцария), Acti CHO (GE Healthcare, Австрия), Balan CD (Irvine Scientific, США) и CD Forti CHO (Life Technologies, США) с добавлением 4—6 мМ аланил-глутамин (Life Technologies, США) согласно рекомендациям производителей. Подсчет числа клеток и анализ их жизнеспособности осуществляли после окрашивания трипановым синим (Panreac, Испания) на счетчике клеток TC10 (BioRad, США).

Культивирование клеток *CHO* с целью продукции ДЭПО проводили в колбах Эрленмейера (емкостью 125 мл или 250 мл) или в одноразовых минибиореакторах TubeSpin 600 (TPP, Швейцария). Для оптимизации гликозилирования культивирование осуществляли в течение 7 сут, при этом в среду вносили подпитки Power Feed A, Power Feed A with lipids (обе — Lonza, Швейцария), Acti CHO Feed A+B (GE Healthcare, Австрия), Balan CD CHO Feed 2 (Irvine Scientific,

Таблица 1

Вещества — предшественники основных субстратов реакций гликозилирования

Целевой субстрат	Предшественники	Роль в гликозилировании
УДФ-галактоза	Галактоза	Образование “ядра” гликанов
ДФ-манноза	Манноза	
УДФ-N-ацетилгалактозамин	N-Ацетил-D-галактозамин	
УДФ-N-ацетилглюкозамин	Глюкозамин, N-ацетил-D-глюкозамин	
ЦДФ-N-ацетилнейраминавая кислота	Глюкозамин (9 реакций), N-ацетил-D-маннозамин, N-ацетилнейраминавая кислота	Присоединение концевых сиаловых кислот

США), Efficient Feed B и Efficient Feed C (Life Technologies, США). Схемы добавления приведены ниже (табл. 2), см. ниже.

Добавки в питательную среду вносили в равных концентрациях на 0-й и 3-й дни культивирования. Использовали следующие вещества (указана суммарная концентрация за 2 внесения): 10 и 20 мМ N-ацетил-D-маннозамин, 10 и 20 мМ глюкозамин, 20 мМ N-ацетил-D-галактозамин, 20 мМ N-ацетил-D-глюкозамин, 20 мМ N-ацетилнейраминовая кислота, 20 мМ манноза, 2 и 5 мМ уридин (все реактивы Carbosynth, Великобритания), 20 мМ и 100 мМ галактоза (VWR, Бельгия).

Анализ концентрации ДЭПО в КЖ осуществляли методом обращено-фазовой ВЭЖХ, как описано в работе [18]. Хроматографическое разделение проводили с использованием системы UltiMate 3000 (Dionex, США) и колонки с фазой C4 (YMC, Япония). Перед началом анализа колонку уравнивали подвижной фазой А (0,1% ТФУ) и подвижной фазой Б (0,1% ТФУ в ацетонитриле) в соотношении по объему 60:40 при скорости потока 1 мл/мин. Градиентную подачу элюентов осуществляли по следующей схеме: за первые 15 мин соотношение фазы А и фазы Б изменялось линейно до 40:60; за следующие 5 мин подача подвижной фазы А линейно сводилась к 0 и осуществлялась промывка в течение 5 мин; после этого за 2 мин подача элюентов возвращалась к первоначальному соотношению. Температура автосамплера составляла $(4,0 \pm 0,1)^\circ$, объем вводимой пробы 25 мкл. Элюирующиеся с колонки компоненты анализировали с помощью УФ-детектора при длине волны 214 нм.

Анализ гликозилирования ДЭПО проводили путем ИЭФ образцов КЖ с помощью систе-

мы MultiphorII (GE Healthcare, Великобритания) с использованием смеси фармалитов, pH 3—10 (GE Healthcare) и pH 2—4 (Serva, Германия). Нагрузка по белку составляла $(2,8 \pm 0,2)$ мкг на дорожку. После завершения фокусирования белок переносили на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, США) с последующим окрашиванием поликлональными антителами к эритропоэтину человека E2531, вторичными антителами A3937, конъюгированными со щелочной фосфатазой, и субстратом для щелочной фосфатазы BCIP/NBT (все реактивы Sigma-Aldrich, США).

В качестве препарата сравнения использовали оригинальный ДЭПО — Аранесп (Amgen, США). Он содержит 6 изоформ (№ 17—22), из которых при ИЭФ детектируются 3 основных (№ 19—21) и три дополнительных (№ 17, 18 и 22).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первый этап оптимизации гликозилирования состоял в выборе питательной среды для культивирования клеток-продуцентов ДЭПО. Было использовано 6 комбинаций наиболее эффективных базовых сред и подпиток от разных производителей (см. табл. 2). Схемы внесения подпиток выбирались исходя из содержания глюкозы в базовой среде и подпитках.

По результатам культивирования для всех сред были достигнуты сравнимые показатели роста клеток: максимальная клеточная плотность составляла $(11,6 — 17,3) \cdot 10^6$ кл/мл, а жизнеспособность на 7-й день культивирования — 94—98% (данные не приведены). При анализе образцов полученных КЖ методом ИЭФ было показано, что только комбинация базовой среды Power CHO-2

Таблица 2

Схема подбора базовых питательных сред и подпиток для культивирования клеток — продуцентов ДЭПО в целях оптимизации гликозилирования

Базовая среда	Подпитка	Схема добавления подпитки
Power CHO-2 CD	Power Feed A	0-е, 3-и, 4-е, 5-е, 6-е сутки — по 5%
Power CHO-2 CD	Power Feed A with lipids	0-е, 3-и, 4-е, 5-е, 6-е сутки — по 5%
Acti CHO	Acti CHO Feed A+B	0-е, 3-и, 4-е, 5-е, 6-е сутки — по 3%
Balan CD	Balan CD Feed 2	0-е, 3-и, 4-е, 5-е сутки — по 5%
CD Forti CHO	Efficient Feed B	0-е, 3-и, 4-е, 5-е, 6-е сутки — по 4%
CD Forti CHO	Efficient Feed C	0-е, 3-и, 4-е, 5-е, 6-е сутки — по 4%

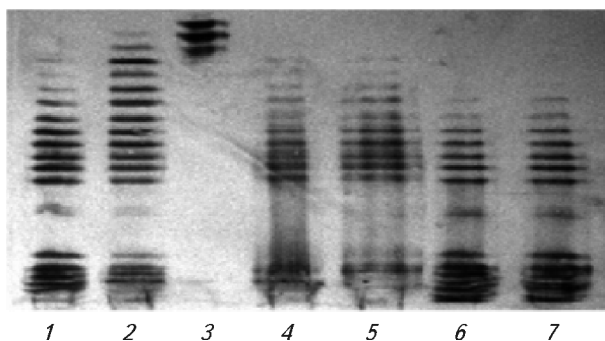


Рис. 1. Изоэлектрофореграмма образцов КЖ клеток продуцентов ДЭПО при культивировании на различных средах: дорожка 1 — среда Power CHO-2 CD с подпиткой Power Feed A; дорожка 2 — среда Power CHO-2 CD с подпиткой Power Feed A with lipids; дорожка 3 — препарат Аранесп; дорожка 4 — среда Acti CHO с подпиткой Acti CHO Feed A+B; дорожка 5 — среда Balan CD с подпиткой Balan CD Feed 2; дорожка 6 — среда CD Forti CHO с подпиткой Efficient Feed B; дорожка 7 — среда CD Forti CHO с подпиткой Efficient Feed C

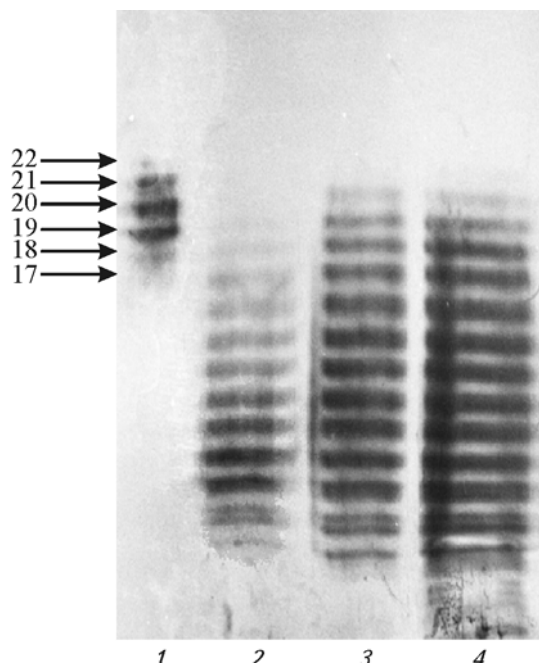


Рис. 2. Изоэлектрофореграмма образцов КЖ клеток продуцентов ДЭПО при культивировании на средах с различными подпитками: дорожка 1 — препарат Аранесп; дорожка 2 — CD Forti CHO с подпиткой Efficient Feed B; дорожка 3 — Power CHO-2 CD с подпиткой Power Feed A with lipids; дорожка 4 — CD Forti CHO с подпиткой Power Feed A with lipids

CD и подпитки Power Feed A with lipids обеспечивает наличие целевых высокосиалированных изоформ № 17—20, присутствующих в оригинальном препарате (рис. 1, дорожки 2 и 3).

По-видимому, именно липидный компонент является основным фактором, обеспечивающим продукцию сиалированных форм целевого

белка, так как аналогичная подпитка, не содержащая липидный компонент, обеспечивала гораздо меньшее содержание этих изоформ. Для проверки этого предположения было дополнительно проведено культивирование клеток в питательной среде CD Forti CHO с подпиткой Power Feed A with lipids, которое показало, что именно подпитка, а не базовая среда, определяет профиль сиалирования ДЭПО (рис. 2).

Существенным являлся тот факт, что обе комбинации питательных сред Power CHO-2 CD и CD Forti CHO с подпиткой Power Feed A with lipids обеспечивали образование клетками-продуцентами преимущественно изоформ № 17—20 с минимальным содержанием изоформы № 21 и полным отсутствием изоформы № 22 (см. рис. 1, дорожка 2 и рис. 2, дорожка 4, соответственно). Поэтому было решено опробовать различные добавки в питательную среду, как описанные ранее в литературе, так и новые, с целью повышения выхода наиболее сиалированных форм ДЭПО.

Выявлено, что добавление уридина, галактозы, N-ацетил-D-галактозамина, N-ацетил-D-глюкозамина и маннозы во всех исследованных концентрациях, а также комбинаций 10 мМ глюкозамина и некоторых из перечисленных веществ не влияло ни на рост клеток, ни на профиль сиалирования ДЭПО. Добавление 20 мМ глюкозамина приводило к гибели клеток на 4-й день культивирования. Добавление 100 мМ галактозы вызывало небольшое (около 30 %) повышение продуктивности клеток; это явление было описано ранее в работе [19], поэтому нами подробно не исследовалось.

Наибольший эффект был достигнут при использовании 10 мМ N-ацетил-D-маннозамина и 10 мМ N-ацетилнейраминной кислоты. При их добавлении в питательную среду фиксировали существенное смещение профиля ИЭФ в сторону кислых, наиболее сиалированных изоформ, причем это смещение не зависело от типа среды (рис. 3, дорожки 3, 4, 6, 7). В результате в КЖ были идентифицированы в высокой концентрации все основные изоформы ДЭПО (№17—21), присутствующие в препарате Аранесп.

Так как одновременное применение обоих веществ, (N-ацетил-D-маннозамина и N-ацетилнейраминной кислоты) достаточно дорого для биофармацевтического производства, была исследована зависимость сдвига профиля сиалирования ДЭПО только от концентрации одного из них — N-ацетил-D-маннозамина. Было показано, что при использовании 20 мМ концентрации содержание высокосиалированных форм несколько выше, чем при 10 мМ (рис. 4, дорожки 3, 4 и 5). Кроме того,

введение 20 мМ N-ацетил-D-маннозамина способствовало нивелированию различий между подпиткой с липидами и без (Power Feed A и Power Feed A with lipids), что позволяет использовать более дешевую и удобную подпитку без липидов.

Полученные результаты согласуются с литературными данными, так как известно, что N-ацетилнейраминная кислота и ее предшественник N-ацетил-D-маннозамин используются клетками для синтеза цитидин-5'-монофосфо-N-ацетилнейраминной кислоты, субстрата реакций сиалирования [14].

Отсутствие эффекта от введения в наших экспериментах глюкозамина, по-видимому, обусловлено сложностью его превращения в целевой субстрат (9 последовательных реакций, из которых одна является лимитирующей). Более трудным представляется объяснение эффекта от внесения липидной подпитки, которая, по данным производителя, содержит водорастворимые производные жирных кислот. Жирные кислоты являются предшественником долихола, еще одного непосредственного участника реакций гликозилирования. Возможно, добавление в среду жирных кислот способствуют более эффективному метаболизму клеток, вследствие чего высвобождаются ресурсы для синтеза гликанов с требуемым составом. Отсутствие эффекта от внесения других моносахаридов можно объяснить тем, что в нашем случае «ядра» гликанов ДЭПО синтезируются клеточной линией правильно, и никакие изменения их структуры не требуются.

Таким образом, в результате проведенных исследований было выявлено, что из большого числа проанализированных добавок 20 мМ N-ацетил-D-маннозамин наиболее существенно повышает выход высокосиалированных форм рекомбинантного ДЭПО, продуцируемого суспензионной культурой клеток CHO. Была показана высокая эффективность внесения в культуральную среду N-ацетилнейраминной кислоты, применение которой для оптимизации гликозилирования рекомбинантных белков ранее в литературе не встречалось. Проведенная оптимизация профиля сиалирования рекомбинантного ДЭПО позволяет получать белок, идентичный препарату сравнения Аранесп по составу изоформ. Следует отметить, что использование добавок в культуральные среды, основанное на современных знаниях в области изучения структур, функций и биологической роли гликанов, может коренным образом повлиять на профиль сиалирования такого сложного гликопротеина, каким является ДЭПО.

Получено 3.02.15

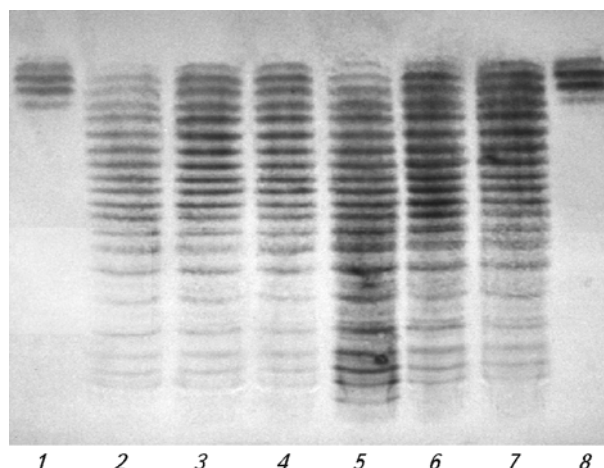


Рис. 3. Изоэлектрофорезная диаграмма образцов КЖ клеток-продуцентов ДЭПО при культивировании в средах Power CHO-2 CD и CD Forti CHO с подпиткой Power Feed A with lipids и добавлением в начале культивирования и на 3-и сутки 10 мМ N-ацетил-D-маннозамина (дорожки 3, 6, соответственно) и 10 мМ N-ацетилнейраминной кислоты (дорожки 4, 7, соответственно). Дорожки 1, 8 — препарат Аранесп; дорожки 2—4 — среда Power CHO-2 CD; дорожки 5—7 — среда CD Forti CHO; дорожки 2, 5 — среды без подпитки

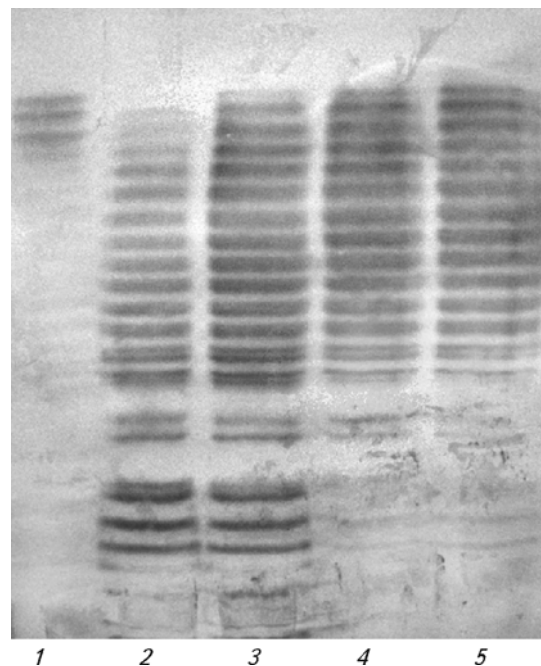


Рис. 4. Изоэлектрофорезная диаграмма образцов КЖ клеток-продуцентов ДЭПО при культивировании на среде Power CHO-2 CD с различными подпитками: дорожка 1 — препарат Аранесп; дорожка 2 — Power Feed A with lipids; дорожка 3 — Power Feed A with lipids и добавлением 10 мМ N-ацетил-D-маннозамина; дорожка 4 — Power Feed A with lipids и добавлением 20 мМ N-ацетил-D-маннозамина; дорожка 5 — Power Feed A и добавлением 20 мМ N-ацетил-D-маннозамина

ЛИТЕРАТУРА

1. *Egrie, J.C.* Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP) / J.C. Egrie, J.K. Browne // *Nephrol. Dial. Transplant.* — 2001. — V. 16. — N 3. — P. 3—13.
2. *Macdougall, I.C.* Darbepoetin alfa: A new therapeutic agent for renal anemia // *Kidney Int.* — 2002. — V. 61. — N 80. — P. 55—61.
3. *Llop, E.* Evaluation of protein N-glycosylation in 2-DE: Erythropoietin as a study case / E. Llop, R.G. Gallego, V. Belalcazar, G.J. Gerwig, J.P. Kamerling, J. Segura, J.A. Pascua // *Proteomics.* — 2007. — V. 7. — N 23. — P. 4278—4291.
4. *Harazono, A.* Mass spectrometric glycoform profiling of the innovator and biosimilar erythropoietin and darbepoetin by LC/ESI-MS / A. Harazono, N. Hashii, R. Kuribayashi, S. Nakazawa, N. Kawasaki // *J. Pharm. Biomed. Anal.* — 2013. — V. 83. — P. 65—74.
5. *Morel, G.* The role of sialic acid in determining glycoproteins in the circulation / G. Morel, G. Gregoriadis, I.H. Scheinberg // *J. Biol. Chem.* — 1971. — V. 246. — P. 1461—1467.
6. *Schiestl, M.* Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals / M. Schiestl, T. Stangler, C. Torella, T. Cepeljnik, H. Toll, R. Grau // *Nat. Biotechnol.* — 2011. — V. 29. — N 4. — P. 310—312.
7. *Kawasaki, N.* The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals / N. Kawasaki, S. Itoh, N. Hashii, D. Takakura, Y. Qin, X. Huang, T. Yamaguchi // *Biol. Pharm. Bull.* — 2009. — V. 32. — N 5. — P. 796—800.
8. *Hossler, P.* Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture / P. Hossler, S.F. Khattak, Z.J. Li // *Glycobiology.* — 2009. — V. 19. — N 9. — P. 936—949.
9. *Durocher, Y.* Expression systems for therapeutic glycoprotein production / Y. Durocher, M. Butler // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2009. — V. 20. — N 6. — P. 700—707.
10. *Gramer, M.J.* Modulation of antibody galactosylation through feeding of uridine, manganese chloride, and galactose / M.J. Gramer, J.J. Eckblad, R. Donahue, J. Brown, C. Shultz, K. Vickerman, P. Priem, E.T. van den Bremer, J. Gerritsen, P.H. van Berkel // *Biotechnol. Bioeng.* — 2011. — V. 108. — N 7. — P. 1591—1602.
11. *Gu, X.* Improvement of Interferon- γ Sialylation in Chinese Hamster Ovary Cell Culture by Feeding of N-Acetylmannosamine / X. Gu, D.I. Wang // *Biotechnol. Bioeng.* — 1998. — V. 58. — N 6. — P. 642—648.
12. *Baker, K.N.* Metabolic control of recombinant protein N-glycan processing in *NS0* and *CHO* cells / K.N. Baker, M.H. Rendall, A.E. Hills, M. Hoare, R.B. Freedman D.C. James // *Biotechnol. Bioeng.* — 2001. — V. 73. — N 3. — P. 188—202.
13. *Лобанова Н.В.* Оптимизация профиля гликозилирования рекомбинантного интерферона-бета-1а при культивировании клеток *CHO* в биореакторе волнового типа / Н.В. Лобанова, А.А. Нурбаков, В.И. Аксенова, А.А. Чупыркина, Н.А. Шамонов, А.А. Клишин, Л.В. Ермолина, Е.Н. Сауткина, Р.А. Хамитов, Ю.А. Серегин // *Биотехнология.* — 2013. — № 2. — С. 55—66.
14. *Freeze, H.H., Elbein, A.D.* Glycosylation Precursors: Essentials of Glycobiology. — 2nd edition. [Eds. A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler]. — NY Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. — Chapter 4.
15. *Gramer, M.J.* Glycosidase activities in Chinese hamster ovary cell lysate and cell culture supernatant / M.J. Gramer, C.F. Gooshee // *Biotechnol. Prog.* — 1993. — V. 9. — P. 366—373.
16. *Gramer, M.J.* Detecting and minimizing glycosidase activities that can hydrolyze sugars from cell culture-produced glycoproteins // *Mol. Biotechnol.* — 2000. — V. 15. — N 1. — P. 69—75.
17. *Kaneko, Y.* Changes in the quality of antibodies produced by Chinese hamster ovary cells during the death phase of cell culture / Y. Kaneko, R. Sato, H. Aoyagi // *J. Biosci. Bioeng.* — 2010. — V. 3. — P. 281—287.
18. *Орлова Н.В.* Валидация методики количественного определения эритропоэтина и дарбэпоэтина в культуральной жидкости с помощью обращено-фазовой хроматографии / Н.В. Орлова, Н.А. Гаврилова, Р.А. Хамитов // *Биофармацевтический журнал.* — 2014. — Т.6. — № 6. — С. 54—59.
19. *Grainger, R.K.* *CHO* cell line specific prediction and control of recombinant monoclonal antibody N-glycosylation / R.K. Grainger, D.C. James // *Biotechnol. Bioeng.* — 2013. — V. 110. — N 11. — P. 2970—2983.

I.N. SAVINOVA¹, N.V. LOBANOVA^{1,*},
N.N. BYKOVA¹, Yu.V. FINOGEEVA¹,
L.I. STARODUBTSEVA¹, A.A. KLISHIN¹,
A.A. NURBAKOV¹, R.R. SHUKUROV¹,
and Yu.A. SERYOGIN²

¹The Limited Liability Company *Pharmapark*, 117246, Moscow Russia

²The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, 117545, Moscow Russia

e-mail : natalya.lobanova@pharmapark.ru

Efficiency of *CHO* Cell Culture Supplementation with Fatty Acids, N-acetyl-D-mannosamine and N-acetylneuraminic Acid for Modification of Recombinant Darbepoetin alpha Sialylation

The selection of medium—feed combination for the improvement of the target glycoforms yield of recombinant darbepoetin alpha produced by *CHO* cell culture has been performed. The impact of various glycan precursors in the glycosylation process on the yield of highly sialylated darbepoetin alpha forms was investigated. The supplementation of the cell culture with 20 mM N-acetyl-D-mannosamine was shown to be most effective for the increase in highly sialylated darbepoetin alpha forms content.

Key words: *CHO* cells, darbepoetin alpha, fatty acids, glycosylation, sialylation.

* Author for correspondence.