

УДК 57.085.23

В.Ю. ТАБАКОВ<sup>1,2,\*</sup>, Ю.А. СЕРЕГИН<sup>3</sup>, И.В. ЧЕСТКОВ<sup>2</sup>, И.Н. САВИНОВА<sup>3</sup>, А.А. КЛИШИН<sup>3</sup>,  
Ю.В. ЩЕПКИНА<sup>1,2</sup>, В.В. ЧЕСТКОВ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва 115478

<sup>2</sup>ООО НПП «ПанЭко», Москва, 115522

<sup>3</sup>ООО «ФАРМАПАРК», Москва, 117246

e-mail: tabakov@paneco-ltd.ru

## Характеристики роста и продукции дарбэпоэтина клеточными линиями *CHO* в бессывороточной, безбелковой среде «Гибрис-1-CHO»

В работе изучены свойства среды Гибрис-1-CHO определенного химического состава, предназначенной для суспензионного культивирования и продукции рекомбинантных белков клетками линий *CHO*. В экспериментах в стационарной культуре и культуре с подпиткой продемонстрированы 2-стадийный характер роста и биохимических показателей для модельной линии *CHO-S*. Данные о скорости роста и плотности культуры, ее морфологии, концентрации ключевых метаболитов, а также культуральных свойствах среды и продуктивности культур по дарбэпоэтину на среде Гибрис-1-CHO в сравнении с коммерческими средами позволяют считать разработанную нами среду пригодной для обеспечения биотехнологического синтеза белков.

*Ключевые слова:* бессывороточная среда, дарбэпоэтин, рекомбинантный белок, суспензионное культивирование, *CHO-S*.

В настоящее время почти 70% всего производства рекомбинантных терапевтических белков осуществляется в результате биотехнологических процессов с использованием генетически модифицированных линий клеток яичника китайского хомяка *CHO* (chinese hamster ovary) [1, 2]. Система синтеза белка в клетках *CHO* обеспечивает посттрансляционное гликозилирование и специфический фолдинг сложных фармакологически активных протеинов [3]. Культуры клеток *CHO* легко адаптируются к бессывороточным, в том числе безбелковым средам, переходя к росту в виде монокультурных суспензий высокой плотности. Оптимизированные системы культивирования, в том

числе высокопроизводительные среды для биореакторных процессов в сочетании с приемами селективной амплификации целевых генов обеспечивают высокий выход активного продукта [4,5].

Коммерческие компании-производители предлагают специализированные бессывороточные среды для обеспечения производственных процессов на основе рекомбинантных клонов линий *CHO* [6]. Нами разработана отечественная бессывороточная среда определенного химического состава Гибрис-1-CHO, обеспечивающая потребности лабораторных и производственных процессов при работе с суспензионными культурами этих линий.

---

Табакوف Вячеслав Юрьевич, Серёгин Юрий Александрович, Честков Илья Валерьевич, Савинова Ирина Николаевна, Клишин Анатолий Анатольевич, Щепкина Юлия Васильевна, Честков Валерий Викторович.

*Список сокращений:* ИП — индекс пролиферации; ОФ-ВЭЖХ — обращено-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография.

\* Автор для переписки.

Целью настоящей работы было исследование основных параметров роста модельной линии *CHO-S* и стабильной линии продуцента дарбэпоэтина *CHO-CMV/rEF1-dEPO* [7] на среде Гибрис-1-CHO. Проведена сравнительная оценка потенциальной пригодности данной среды для продукции рекомбинантного терапевтического белка.

#### УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Коммерчески доступная, адаптированная к суспензионному росту в бессывороточных средах линия *CHO-S* (Invitrogen, США) была использована для исследования свойств среды Гибрис-1-CHO («ПанЭко»). Для анализа свойств среды в условиях интенсивного культивирования *CHO-S* помимо стационарной культуры использовали систему fed-batch-культивирования с введением комплексной добавки (подпитка для среды Гибрис-1-CHO, «ПанЭко») в количестве 3% по объему ежесуточно начиная с 72-го часа от начала культивирования. До эксперимента клетки выращивали на среде Гибрис-1-CHO в течение 8 последовательных пассажей. При подготовке культуры добивались значения плотности суспензии на третьи сутки роста, равной  $2 \cdot 10^6$  кл/мл, при начальной плотности посеваемой суспензии  $1,0 \cdot 10^5$  кл/мл. В эксперименте начальная плотность культуры составляла  $(2,0—3,0) \cdot 10^5$  кл/мл. Технически подготовку культуры и эксперимент проводили на круговой качалке при 125 об/мин в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора (5% CO<sub>2</sub>, 37°) (Celltron, Infors, Швейцария). Рабочий объем культуры составлял 12,5 мл в биореакторных флаконах («ПанЭко») емкостью 75 мл.

Основные показатели роста экспериментальных культур определяли ежесуточно начиная с 72-го часа от начала пассирования. Количество жизнеспособных клеток в культуре оценивали методом исключения с окраской трипановым-синим и с использованием камеры Горяева.

Для адекватной оценки уровня глюкозы и накопления лактата применяли биохимический анализатор для экспресс-определения этих показателей в крови человека Accutrend Plus (Roche Diagnostics GmbH, Германия).

Показатель времени удвоения клеток в экспериментальных культурах  $T_2$  вычисляли по формуле:

$$T_2 (\text{ч}) = t, (\text{ч}) \cdot \ln 2 / \ln III [8],$$

где  $t$  — время определения  $T_2$  в логарифмической стадии роста культуры (96 ч в условиях культивирования без подпитки и 120 ч при культивировании с подпиткой),  $III$  — индекс пролиферации

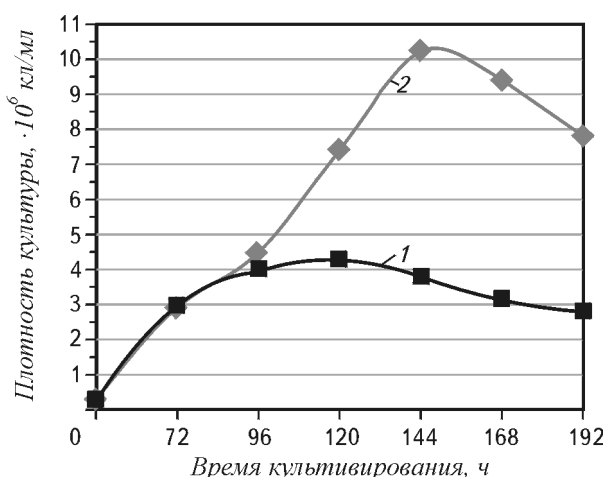
( $III = N_t / N_0$ );  $N_t$  — число клеток в единице объема среды на момент времени  $t$ ,  $N_0$  число клеток в единице объема среды в начале пассажа.

Сравнительное исследование цикла продукции рекомбинантного дарбэпоэтина на среде Гибрис-1-CHO осуществляли с использованием стабильной производственной клеточной линии *CHO-CMV/rEF1-dEPO* [7]. Культивирование проводили в одноразовых колбах Эрленмейера (125 мл, Corning, США) с рабочим объемом культур 20 мл при перемешивании в условиях, аналогичных использованным в работе с *CHO-S*. Параметры роста и продукции сравнивали с показателями 3 коммерчески-доступных сред известных фирм-производителей: MAM-pF 77 (Amimed, Швейцария); CD Forti CHO (Gibco, США); Power CHO-2 CD (Lonza, Швейцария), — которые в дальнейшем обозначены как среда 1, 2 и 3, соответственно. Для оптимизации продукции целевого белка начиная с 72-го часа в среды вводили коммерческую подпитку FMS3 (Amimed, Швейцария) в количестве 1,8% по объему. Цикл продукции завершали при уменьшении жизнеспособности клеток в культурах до величины ниже 80%. Основные показатели роста и концентрации метаболитов в средах определяли, как описано выше.

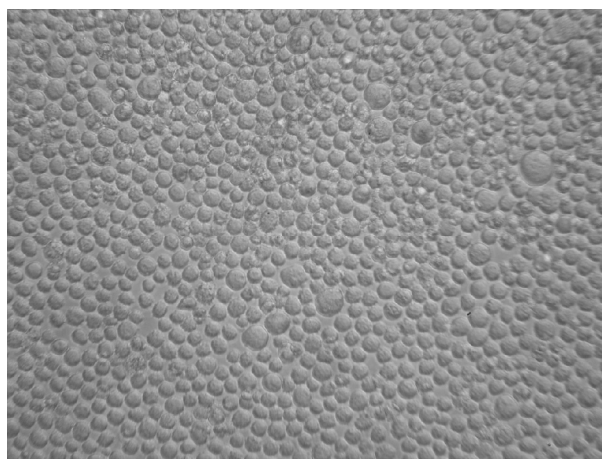
Концентрацию целевого белка измеряли с помощью ОФ-ВЭЖХ, как описано в работе [9].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что плотность суспензии клеток и время удвоения популяции являются важными характеристиками сред, в частности, бессывороточных, используемых для продукции рекомбинантных белков [10]. Типичные кривые роста экспериментальных культур *CHO-S* на среде Гибрис-1-CHO в условиях культивирования без подпитки и с подпиткой представлены на рис. 1. Согласно данным пяти независимых экспериментов максимальные значения плотности суспензии жизнеспособных клеток при культивировании без подпитки ( $I$ ) наблюдались на 5-е—6-е сутки пассажа и достигали уровня  $3,8—4,6 \cdot 10^6$  кл/мл. При этом показатель времени удвоения культуры  $T_2$  варьировал от 21,8 — 22,9 ч. Соответствующие данные, полученные при культивировании с подпиткой, обнаруживали сдвиг максимума плотности клеточной суспензии на 6-е—7-е сутки, которая составила  $(8,5—10,3) \cdot 10^6$  кл/мл. Время удвоения культуры снижалось до 19,7—20,4 ч. Вплоть до 120—144 ч культивирования для культуры без подпитки и 144—168 ч для культуры с подпиткой, в популяции отсутствовали выраженные призна-



**Рис. 1.** Динамика плотности жизнеспособных клеток *CHO-S* в перемешиваемых культурах на среде Гибрис-1-СНО при культивировании без подпитки (1) и с подпиткой (2). Начальная плотность культуры в пассаже  $3,0 \cdot 10^5$  кл./мл

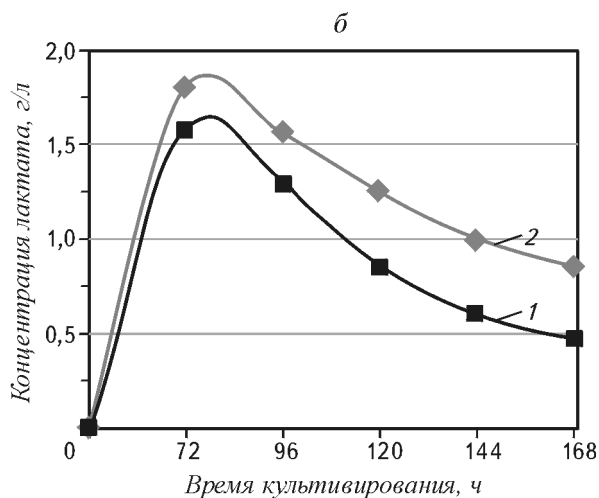
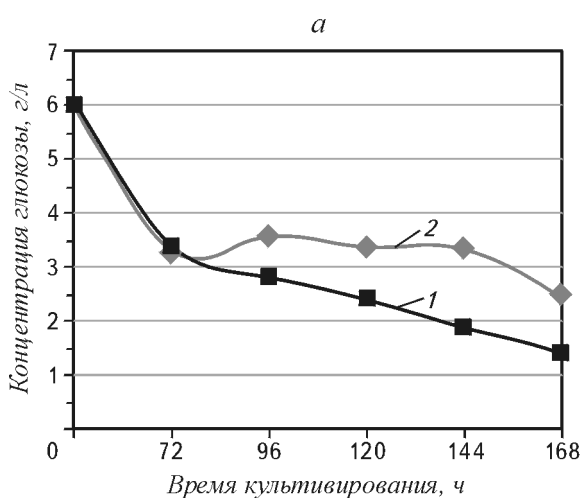


**Рис. 2.** Микроскопическая характеристика суспензионного роста культуры клеток *CHO-S* на среде Гибрис-1-СНО в условиях культивирования с подпиткой (светлое поле, увеличение  $\times 200$ , 144 ч культивирования)

ки деградации культуры (определяемые микроскопически наличие агрегатов и мертвых клеток, гетероморфность по форме и размерам клеточных тел, неоднородность структуры цитоплазмы) (рис. 2).

Как и любая активно растущая *in vitro* линия клеток, *CHO* демонстрирует высокую интенсивность анаэробных стадий гликолиза для обеспечения энергетического метаболизма и анаболических процессов несмотря на высокую интенсивность аэрации культуры. Поэтому значимыми биохимическими параметрами метаболизма и состояния культуры являются показатели скорости потребления глюкозы и накопления лактата в среде культивирования [11]. Динамика концентрации глюкозы и лактата в культурах *CHO-S* на среде

Гибрис-1-СНО в системах с подпиткой и без представлена на рис.3, а, б. Полученные данные четко демонстрируют 2-стадийный характер энергетического метаболизма в обеих системах культивирования: интенсивное потребление глюкозы и накопление лактата на первой стадии развития культуры 0—72—96 ч и замедленное потребление глюкозы и одновременно утилизация лактата на второй. Подобный профиль динамики ключевых метаболитов обусловлен интенсификацией аэробных механизмов гликолиза на стадии перехода к поздней логарифмической фазе роста и далее к стационарной фазе [12,13]. В ряде исследований показано, что синтез и созревание рекомбинантных белков тесно связаны с аэробными стадиями



**Рис. 3.** Динамика концентрации ключевых метаболитов энергетического обмена клеток *CHO-S* на среде Гибрис-1-СНО в условиях культивирования без подпитки (1) и с подпиткой (2): а — глюкоза; б — лактат

гликолиза, которые наиболее активно осуществляются в этот период развития культуры [13]. Следует отметить, что при создании рецептуры среды Гибрис-1-СНО авторы вели целенаправленную работу по обеспечению субстратами и продлению периода продуктивной фазы роста культуры клеток *CHO*.

Различия в динамике биохимических показателей для систем культивирования без подпитки и с подпиткой связаны с различной концентрацией утилизируемых субстратов и уровнем достигаемой клеточной плотности. Так, концентрация глюкозы в системе культивирования без подпитки экспоненциально снижается до величин, не превышающих 1,5 г/л на 168 ч культивирования. Введение подпитки позволяет поддерживать глюкозу на уровне значений 3,0—3,5 г/л. При этом скорость утилизации лактата в системе с подпиткой снижается благодаря интенсивным процессам анаэробного гликолиза в культуре высокой клеточной плотности при ежедневном восполнении пула глюкозы.

Параметры роста клеточной линии *CHO-CMV/rEF1-dEPO* на среде Гибрис-1-СНО существенно не отличались от таковых для клеток *CHO-S*. Суммарно по данным 7 последовательных пассажей время удвоения составило 19,6—22,7 ч с тенденцией к уменьшению по мере адаптации клеток к новой среде.

При проведении цикла продукции на трех разных коммерчески доступных средах и Гибрис-1-СНО были зафиксированы следующие культуральные характеристики (рис. 4). Цикл культивирования продолжался 9—10 дней за исключением среды 2, в которой наблюдалась сильная агрегация клеток и гибель культуры на 7-й день. Сравнительно малая продолжительность цикла продукции связана со значительной выработкой клетками лактата, концентрация которого в отличие от таковой для клеточной линии *CHO-S* не снижалась в процессе культивирования ни на одной из сред при условии введения коммерческой подпитки FMS3. В результате концентрация лактата достигала следующих максимальных значений: 2,6 г/л для среды 1; 1,4 г/л в случае неоптимальной для культивирования продуцента среды 2; 2,2 г/л для среды 3 и 1,8 г/л для среды Гибрис-1-СНО. Можно предположить, что сравнительно низкая концентрация лактата при культивировании в среде Гибрис-1-СНО позволяет клеткам сохранять жизнеспособность на сутки дольше (см. рис. 4, 2).

Максимальная продуктивность клеток была достигнута при культивировании на среде 1; Гибрис-1-СНО показала несколько меньшую про-

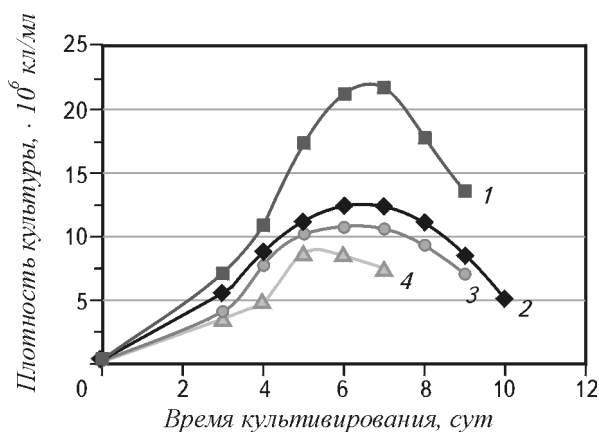


Рис. 4. Культуральные характеристики клеточной линии *CHO-CMV/rEF1-dEPO* при выращивании в четырех разных средах с подпитками: 1 — среда 1; 2 — Гибрис-1-СНО; 3 — среда 3; 4 — среда 2

дуктивность, а две оставшиеся среды существенно отличались в худшую сторону (рис. 5). При этом в пересчете на одну клетку наибольшей оказалась продуктивность на среде Гибрис-1-СНО.

Важнейшим показателем фармакологической активности препаратов дарбэпоэтина является профиль изоформ по уровню гликозилирования протеина. Проведенный в отдельном исследовании анализ показал, что профиль заряженных изоформ дарбэпоэтина был практически одинаков на всех четырех испытанных питательных средах и соответствовал описанному нами ранее в работе [14].

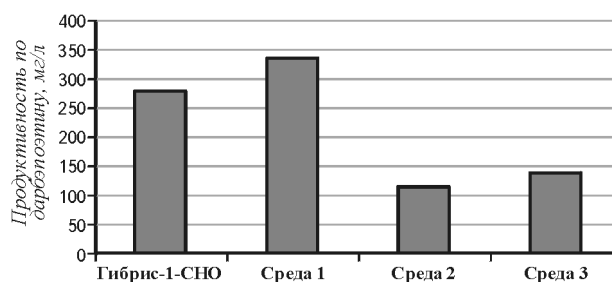


Рис. 5. Продуктивность по дарбэпоэтину клеточной линии *CHO-CMV/rEF1-dEPO* при культивировании в четырех средах с подпитками (см. подпись к рис. 4)

Таким образом, суммируя данные, полученные на модельной и производственной клеточных линиях, можно говорить о том, что отечественная среда химически определенного состава Гибрис-1-СНО пригодна для обеспечения производства рекомбинантных белков в суспензионных культурах *CHO*, поддерживая рост культур и продукцию ими дарбэпоэтина.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kishwar, H. K. Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications // *Adv. Pharm. Bull.* — 2013. — V.3(2). — P. 257—263.
2. Jayapal, K.P. Recombinant protein therapeutics from CHO cells—20 years and counting / K.P. Jayapal, K.F. Wlaschin, W.S. Hu, M.G. Yap // *Chem. Eng. Prog.* — 2007. — V.103. — P.40—47.
3. Dingermann, T. Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges // *Biotechnol. J.* — 2008. — V.3. — P.90—97.
4. Agrawal, V. Strategies for Rapid Production of Therapeutic Proteins in Mammalian Cells / V. Agrawal, B. Manjot // *Bio-Process Int.* — 2012. — V.10(4). — P.32—48.
5. Kim, J.Y. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential / J.Y. Kim, Y.G. Kim, G.M. Lee // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2012. — V.93. — P.917—930.
6. The Dr Hadwen Trust (DHT): UK's leading non-animal medical research charity (2014). URL: <http://www.drhadwentrust.org/science-and-education/serum-free-media> (дата обращения: 16.01.15).
7. Шукуров П.П. Создание стабильной клеточной линии — продуцента рекомбинантного дарбэпоэтина-альфа на основе клеток CHO / П.П. Шукуров, К.Ю. Казаченко, Д.Г. Козлов, А.А. Нурбаков, Е.Н. Сауткина, Р.А. Хамитов, Ю.А. Сергин // *Биотехнология.* — 2013. — № 2. — С. 46—54.
8. Patterson, M.K. Measurement of growth and viability of cells in culture // *Methods Enzymol.* — 1979. — V.58. — P.141—152.
9. Нурбаков А.А. Оптимизация технологии культивирования клеток CHO, экспрессирующих рекомбинантный дарбэпоэтин-альфа, в замкнутом объеме с подпиткой / А.А. Нурбаков, Н.В. Лобанова, И.Н. Савинова, Р.П. Шукуров, Н.В. Орлова // *Биотехнология.* — 2012. — №5. — С. 55—65.
10. Петров А.В. Адаптация клеток линии CHO-K1 к суспензионному культивированию в коммерческих бессывороточных средах / А.В. Петров, Н.В. Пигарева, Б.В. Мурашев, М.М. Карасев, А.С. Симбирцев // *Биотехнология* — 2012. — №2. — С.1—9.
11. Zagari, F. Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity / F. Zagari, M. Jordan, M. Stettler, H. Broly1, F.M. Wurm // *New Biotechnol.* — 2013. — V.30(2). — P.238—245.
12. Ma, N. A single nutrient feed supports both chemically defined NS0 and CHO fed-batch processes: improved productivity and lactate metabolism / N. Ma, J. Ellet, C. Okediadi, P. Hermes, E. McCormick, S. Casnocha // *Biotechnol. Prog.* — 2009. — V. 25(5). — P.1353—1363.
13. Templeton, N. Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture / N. Templeton, J. Dean, P. Reddy, J.D. Young // *Biotechnol. Bioeng.* — 2013. — V.110(7). — P.2013—2024.
14. Савинова И.Н. Эффективность жирных кислот, N-ацетил-D-маннозамина и N-ацетилнейраминовой кислоты для модификации сиалирования рекомбинантного дарбэпоэтина альфа в культуре клеток CHO / И.Н. Савинова, Н.В. Лобанова, Н.Н. Быкова, Ю.В. Финогенова, Л.И. Стародубцева, А.А. Клишин, А.А. Нурбаков, Р.П. Шукуров, Ю.А. Сергин // *Биотехнология.* — 2015. — №.1. — С. 22—28.

V.Yu. TABAKOV<sup>1,2,\*</sup>, Yu.A. SERYOGIN<sup>3</sup>, I.V. CHESTKOV<sup>2</sup>, I.N. SAVINOVA<sup>3</sup>, A.A. KLISHIN<sup>3</sup>, Yu.V. SHCHERPKINA<sup>1,2</sup>, and V.V. CHESTKOV<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>The Research Centre for Medical Genetics (RCMG), 115478, Moscow Russia

<sup>2</sup>PanEco, Ltd., Research&Production Biomedical Company, 115522, Moscow Russia

<sup>3</sup>The Limited Liability Company *Pharmapark*, 117246, Moscow Russia

e-mail: tabakov@paneco-ltd.ru

### Growth Characteristics and Darbepoietin Production by CHO Cell lines in Chemically Defined Serum and Protein-free Hybris-1-CHO Medium

A chemically defined medium Hybris-1-CHO designed for suspension culturing and recombinant protein production by CHO cell lines has been characterized. The two-stage character of cell growth and basic biochemical parameters was demonstrated in both batch and fed-batch experiments with the CHO-S model cell line. The data on the culture growth rate, its morphology, concentrations of key metabolites, and also culturing characteristics of the medium and darbepoietin productivity of the cultures on Hybris-1-CHO in comparison with a few commercial media permit to regard the designed medium as applicable to maintaining of protein biotechnological production.

*Key words:* CHO-S; darbepoietin; recombinant protein; serum-free medium; suspension culturing.

\* Author for correspondence.