

УДК 602.6:612

Оптимизация состава питательных сред для культивирования клеточной линии *CHO* – продуцента моноклонального антитела Адалимумаб к фактору некроза опухолей альфа

© 2016 г. Е.В. ВОРОНИНА^{1,*}, Н.В. ЛОБАНОВА¹, А.В. СУХОЖЕНКО², А.А. КЛИШИН¹, И.Н. САВИНОВА¹, Ю.А. СЕРЕГИН¹

¹ООО «Фармапарк», Москва, 117246

²ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ГосНИИгенетика), Москва, 117545

*e-mail: voronina@pharmapark.ru

Поступила в редакцию 25.05.16

Принята в печать 02.08.16

В работе описана стратегия оптимизации профиля гликозилирования моноклонального антитела к фактору некроза опухолей альфа, Адалимумаб, продуцируемого суспензионной культурой клеток *CHO*. Адалимумаб – это аналог моноклонального антитела, которое служит основной составляющей препарата Хумира (Humira), выпускаемого компанией Abbot GmbH & Co. KG (США). В разработке соответствующей технологии ориентировались на способ культивирования в замкнутом объеме с периодическим добавлением подпиток (fed-batch), используя большой набор питательных сред и подпиток от разных производителей. Все среды и подпитки не содержали компоненты животного происхождения и были предназначены для суспензионного культивирования клеток *CHO*. Анализ отделенных от антитела олигосахаридов и их сравнение с компонентами оригинального препарата осуществляли с использованием хроматомасс-спектрометрии. Были исследованы три партии данного препарата; во всех обнаружены типичные гликаны моноклональных антител, произведенных в клетках *CHO*: комплексные фукозилированные G0F/G1F/G2F и нефукозилированные G0/G1, а также гликаны с пятью остатками маннозы (Man5). Соотношение форм гликанов также оказалось вполне типично для антител, полученных с использованием клеток *CHO*: преимущественные формы содержали фукозу и не содержали галактозу. На основе полученных профилей гликанов, а также анализа продуктивности при разных условиях культивирования для дальнейших исследований было выбрано сочетание среды Dynamis (Gibco, США) и подпитки ActiCHOA/B (GE Healthcare, Австрия), которые обеспечивали продуктивность по антителу 1,58 г/л в режиме fed-batch. Было установлено, что по содержанию остатков галактозы (19,6% в полученном препарате против 23,5% в оригинальном) и фукозы (85,7% против 88,7%) полученное антитело близко к оригинальному, т.е. содержание основных гликанов и составляющих их моносахаридов приближено к желаемому. Существенное отличие обнаруживается только по содержанию минорного гликана Man5: 1,7% против 6,3%. Значимость данных различий можно оценивать двояко: с одной стороны, они находятся вне пределов изменчивости оригинального препарата, с другой – они получены на раннем этапе разработки препарата, при культивировании в малом объеме.

Ключевые слова: гликозилирование, клетки *CHO*, культивирование, оптимизация.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-6-60-67

Терапевтические моноклональные антитела (моноАТ) принадлежат к наиболее востребованным продуктам биотехнологического рынка. Они используются для терапии многих онкологических [1, 2], аутоиммунных [3, 4] и вирусных [5] заболеваний. Как правило, моноАТ производят с помощью суспензионной культуры клеток яични-

ков китайского хомячка (*CHO*), однако есть и случаи применения для этой цели клеток миеломы *Sp2/0* [1] и *NS0* [6].

Адалимумаб – моноклональное антитело против цитокина TNF α , эффективное для лечения ревматоидного артрита [4] и болезни Крона [7]. Первоначальной концепцией при разработке ан-

Список сокращений: КЖ – культуральная жидкость; моноАТ – моноклональное(ые) антитело(а); ADCC (Antibody-Dependant Cell-mediated Cytotoxicity) – антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность; CDC (Complement-Dependant Cytotoxicity) – комплемент-зависимая цитотоксичность; TNF α (Tumor Necrosis Factor α) – фактор некроза опухолей альфа.

тител против данного цитокина было придание им способности блокировать функции TNF α как медиатора воспаления [8]. К тому времени уже было известно, что эти функции может осуществлять как растворимая, так и трансмембранная форма цитокина [9].

В ходе дальнейших исследований было показано, что антитело Адалимумаб при связывании с трансмембранной формой TNF α , представленной на поверхности макрофагов и Т-лимфоцитов, может индуцировать комплемент-опосредованную цитотоксичность (CDC) и антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) против данных клеток [10]. В результате у больных удается контролировать пул лимфоидных клеток, отвечающих за выработку TNF α , чем объясняется преимущество Адалимумаба и других антител в лечении болезни Крона по сравнению с неантительными антагонистами данного цитокина, например этанерцептом [10].

Препарат Адалимумаб представляет собой полностью человеческое антитело, что обуславливает его сниженную иммуногенность, проявляющуюся, в частности, в уменьшении частоты аллергических реакций.

Практически все современные терапевтические моноАТ, как и их природные аналоги, являются гликопротеинами [11], и большинство из них имеют один сайт N-связанного гликозилирования в константной области тяжелой цепи [12]. Благодаря своему расположению в молекуле антитела гликаны не влияют на связывание с антигенами, но являются одним из основных факторов, определяющих эффекторные функции антител [13]. В частности, отсутствие остатка фукозы в молекуле антитела вызывает многократное усиление ADCC за счет лучшего связывания с рецептором Fc γ RIII [14], а присутствие концевых остатков галактозы – увеличение аффинности системы комплемента к белку C1q [15] и повышение CDC [16].

Интересным свойством антител, содержащих концевые остатки галактозы и сиаловых кислот, является их противовоспалительное действие [17,18]. Наконец, гликаны с высоким содержанием маннозы обеспечивают более быстрый клиренс антител, что рассматривается как негативное явление [19]. Таким образом, значимость гликозилирования моноклональных антител не вызывает сомнения.

В настоящее время основным производителем Адалимумаба (в форме препарата Humira) является компания Abbot GmbH & Co. KG (США). Разработка технологии производства современ-

ных высокоэффективных отечественных лекарственных биосимиляров на основе моноклональных антител является актуальной задачей. Поэтому целью данного исследования являлось получение стабильной клеточной линии – продуцента моноклонального антитела Адалимумаб к фактору некроза опухолей альфа и оптимизация профиля его гликозилирования. При этом оптимальное гликозилирование должно было быть реализовано на стадии культивирования, поскольку различные гликоформы антител мало отличаются по своим характеристикам и их разделение на этапе очистки представляет нетривиальную задачу.

Для оптимизации гликозилирования рекомбинантных белков, производимых клетками млекопитающих, используются разные подходы, в первую очередь, основанные на подборе состава питательных сред. Например, для улучшения галактозилирования эффективно добавление в среду смеси уридина, соли марганца и галактозы [20], сиалирования – сиаловых кислот или их предшественника N-ацетил-D-маннозамина [21]; для повышения содержания гликанов с высоким содержанием маннозы – собственно маннозы [22]. Также есть соответствующие подходы, основанные на выборе физико-химических параметров культивирования [23, 24].

Таким образом, решение задачи приведения профиля гликанов в соответствие с неким заданным стандартом (оригинальным препаратом) может состоять в сочетании описанных выше подходов в зависимости от того, какой конкретно параметр предстоит оптимизировать.

В настоящем исследовании был реализован один из подходов к решению указанной задачи, а именно, использование состава питательной среды как фактора оптимизации профиля гликозилирования биоаналога антитела Адалимумаб, а также повышения продуктивности линии клеток *CHO* по данному антителу.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Использовалась суспензионная клеточная линия *CHO-DHFR-ADMB26*, разработанная авторами настоящей статьи на основе *DHFR*-системы и стабильно продуцирующая моноклональное антитело Адалимумаб. Культивирование проводили в шейкере-СО₂-инкубаторе Multitron Cell (Infors, Швейцария) в одноразовых колбах емкостью 125 мл (Corning, США). Объем заполнения колб составлял 15–20 мл, скорость перемешивания – 120 об/мин; в шейкере поддерживалась 5%-ная концентрация СО₂ и 80%-ная влажность. Каждые

3–4 дня определяли плотность клеточной суспензии и жизнеспособность клеток с помощью счетчика клеток TC10 (BioRad, США), а также проводили субкультивирование путем разбавления суспензии клеток свежей средой до плотности $0,3 \cdot 10^6$ кл/мл.

В разработке ориентировались на способ культивирования в замкнутом объеме с подпитками (fed-batch) в колбах. Использовали большой набор питательных сред и подпиток от разных производителей (табл. 1). Все среды и подпитки не содержали компонентов животного происхождения и были предназначены для суспензионного культивирования клеток *CHO*.

Адаптацию клеток к новым средам проводили следующим образом. В день очередного субкультивирования вносили суспензию клеток в смесь равных объемов старой и новой среды до плотности $0,5 \cdot 10^6$ кл/мл. При следующем пассаже помещали суспензию в полностью новую среду из расчета получения такой же начальной плотности. После этого проводили не менее 4 пассажей в новой среде с плотностью посева $0,3 \cdot 10^6$ кл/мл до стабилизации времени удвоения. Поскольку такая схема адаптации позволяла поддерживать высокую жизнеспособность культуры, более сложные подходы не использовали.

Для культивирования с подпитками применяли как схемы, рекомендованные производителями, так и модифицированные протоколы. Использовали колбы объемом 125 мл и шейкер-СО₂-инкубатор (см. выше). Ежедневно, начиная с 3-го дня,

определяли плотность суспензии и жизнеспособность клеток и измеряли концентрацию глюкозы в КЖ с помощью анализатора Accutrend Plus (Roche, США). При необходимости добавляли глюкозу до концентрации 5 г/л вместе с подпиткой. Также на 7-е и 10-е сутки культивирования определяли концентрацию лактата с использованием того же анализатора. Цикл культивирования завершали при падении жизнеспособности клеток ниже 70%.

Расчет времени удвоения и удельной продуктивности культуры (пг/кл/сут) проводили согласно стандартной методике [25].

Концентрацию целевого белка определяли с помощью ВЭЖХ методом гель-фильтрации на колонке TSKgel G2000SW (Tosoh Bioscience, Германия).

Для анализа профиля гликанов моноклональное антитело отделяли от культуральной среды на центрифужных колонках Protein A HP SpinTrap (GE Healthcare, США). Подготовку проб к анализу гликанов осуществляли путем ферментативного дегликозилирования 500 мкг обессоленной субстанции моноклонального антитела ферментом N-гликозидазой (Roche). Для обессоливания образцов использовали микроцентрифужные концентраторы VivaSpin 500 (Sartorius). Начальный объем концентрировали примерно в 10 раз в 5 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,0, в 3 стадии на центрифуге Eppendorf 5417R (Германия) при 10 000g и 4°C. Конечный объем обес-

Таблица 1

Среды и подпитки, использованные в работе

Media and feeds used in this work

Среда	Подпитка	Производитель
SFM4CHO	Cellboost 1–6	GE Healthcare (Hyclone/PAA) (Австрия)
Hyclon	То же	То же
CDM4CHO	ActiCHO Feed A/B	« «
ActiCHO P CD	То же	« «
Dynamis	Efficient Feed A+, B+, C+	Life Technologies (Gibco, США)
OptiCHO	То же	То же
MAM-PF77	FMS3, FMU	Amimed (Великобритания)
CellVento 200/210/220	Cellvento Feed 200/210/220	Merck (Германия)
EX-Cell Advanced	EX-Cell Advanced Feed 1	Sigma-Aldrich (США)
BalanCD Growth A	BalanCD Feed 1,2,3	Irvine Scientific (США)
PowerCHO-2CD	PowerFeed A	Lonza (Бельгия)

соленых образцов доводили буфером до 250 мкл. Затем вносили фермент N-гликозидазу и проводили дегликозилирование препарата в соответствии с рекомендациями производителя. Реакцию останавливали путем замораживания образцов при -30°C .

Анализ отделенных олигосахаридов осуществляли с использованием хроматомасс-спектрометрии (на хроматографе 1260 Infinity (Agilent, США) с подключенным к нему масс-спектрометром Bruker Maxis Impact (QqTOF, Германия)). Принцип анализа заключался в предварительном разделении молекул целевых гликанов и сопутствующих компонентов матрицы на хроматографической колонке с последующей ионизацией гликанов и других компонентов матрицы при электрораспылении в ионном источнике масс-спектрометра, а также разделением и детекцией образовавшихся ионов в масс-анализаторе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выбора критериев приемлемости профиля гликозилирования полученного продукта было проведено исследование профиля гликанов

у оригинального препарата (табл. 2). Были исследованы образцы трех партий данного препарата, и обнаружены типичные гликаны моноклональных антител, продуцируемые клетками CHO: комплексные фукозилированные G0F/G1F/G2F и нефукозилированные G0/G1, а также гликаны с 5 остатками маннозы (Man5). Соотношение форм гликанов также оказалось вполне типично для клеток CHO: они преимущественно содержали фукозу, а не галактозу [11].

На основании предварительных экспериментов было решено, что оптимальным процессом производства данного моноклонального антитела является культивирование в замкнутом объеме с периодическим добавлением подпиток. Для достижения максимальной продуктивности клеточной линии был проведен скрининг коммерчески доступных питательных сред. На этом этапе подпитки не добавляли, и измеряли время удвоения клеток и удельную продуктивность на 4-й день культивирования (табл. 3).

Как видно из табл. 3, наблюдались существенные различия между средами по обоим исследуемым параметрам, которые позволили определить лидирующую группу, состоящую из Dynamis, SFM4CHO, CellVento-210 и ActiCHO P CD,

Таблица 2

Содержание гликозилированных форм, %, в трех исследованных партиях оригинального препарата Humira (Abbot GmbH&Co. KG)

Contents of glycosylated forms, %, in original preparation of Humira (Abbot GmbH & Co. KG) (three lots)

Гликан	Номенклатура	Содержание форм в различных партиях			Среднее значение по всем партиям
		1	2	3	
Фукозилированный	G0F	62,3	63,7	66,0	64,0±1,5
	G1F	21,2	19,8	18,6	19,9±1,1
	G2F	2,0	1,7	1,6	1,8±0,2
Нефукозилированный	G0	6,1	6,5	6,7	6,4±0,2
	G1	1,9	1,8	1,7	1,8±0,1
С пятью остатками маннозы	Man5	6,7	6,7	5,5	6,3±0,6
Среднее суммарное содержание остатков	F				85,7
	G				23,5
	Man5				6,3

Примечание. Цифра в номенклатуре комплексных гликанов указывает число остатков галактозы на одну молекулу олигосахаридов.
Footnote. Figure in designations of complex glycans indicates number of galactose residues per oligosaccharide molecule.

Характеристики роста клеточной линии CHO-DHFR-ADMB26 на различных коммерческих средах на 4-й день культивирования**Characteristics of CHO-DHFR-ADMB26 cell line growth on various commercially available media on 4th day of culturing**

Среда	Время удвоения, ч	Удельная продуктивность, мг/кл/сут
BalanCD Growth A	28	7,2
Dynamis	25	9,2
OptiCHO	24	10,4
MAM-PF77	31	6,5
Hycell	31	8,8
SFM4CHO	26	15,6
PowerCHO-2CD	34	10,2
CellVento-200	27	10,7
CellVento-210	26	11,7
ActiCHO P CD	24	7,9

обеспечивающих довольно высокую удельную продуктивность и время удвоения 24–26 ч. Эти среды были отобраны в надежде на перспективные результаты их использования в опытах с подпиткой.

Вторым этапом оптимизации был подбор подпиток; при этом клетки выращивали до падения жизнеспособности не ниже 70% независимо от времени культивирования (как это часто используется при получении моноАТ). Применяли все перечисленные выше подпитки в комбинациях с четырьмя лидирующими средами. На основании предыдущих исследований использовали не все возможные, а только те комбинации четырех вышеуказанных сред и подпиток, которые с наибольшей вероятностью могли обеспечить высокий результат культивирования. При этом каждая подпитка была проанализирована не менее, чем с двумя средами разных производителей. В табл. 4 приведены результаты лучших комбинаций с продуктивностью по антителу не ниже 0,7 г/л. Все подпитки вносили, начиная с 3-го дня культивирования, до указанного конечного содержания в объеме среды.

Образцы антитела, полученные с использованием указанных сред, анализировали на содержание гликанов (см. табл. 4). В результате сравнения профилей гликанов полученного и оригинального препаратов и с учетом уровня продуктив-

ности для дальнейших исследований была выбрана комбинация № 4 с максимальной продуктивностью 1,58 г/л. По содержанию остатков галактозы (19,6% в полученном против 23,5% в оригинальном препарате) и фукозы (88,7% против 85,7%) (табл. 2, 4) антитело, продуцируемое на этой среде, наиболее близко к оригинальному препарату. Существенное отличие обнаруживается только по содержанию минорного гликана Man5 – 1,7% против 6,3%.

Таким образом, содержание основных гликанов и составляющих их моносахаридов в продукте оказалось близко к желаемому. Что касается гликана Man5, то, как было отмечено, его присутствие является нежелательным для препаратов антител из-за обусловленного им повышенного клиренса, в связи с чем его более низкая концентрация в полученном продукте по сравнению с оригинальным препаратом может рассматриваться как преимущество. Кроме того, известно, что масштабирование процесса от колбы до биореактора зачастую приводит к существенным изменениям характеристик целевого белка, включая и гликозилирование. Поэтому окончательная оценка соответствия содержания гликанов в полученном продукте и оригинальном препарате будет проведена и опубликована позднее.

Таким образом, показано, что при использовании различных коммерчески доступных пи-

Комбинации сред и подпиток, обеспечивающих высокую продуктивность клеточной линии CHO-DHFR-ADMB26, и профиль гликозилирования антитела при их использовании**Combinations of media and feeds that ensure high productivity of CHO-DHFR-ADMB26 cell line, and glycosylation profile they provide**

№ схемы	Среда	Подпитка (% от объема культуры)	Продук- тивность, г/л	Содержание гликозилированных форм, %					
				G0F	G1F	G2F	G0	G1	Man5
1	ActiCHO P CD	ActiCHO Feed (1,5)	1,24	34,45	45	10,3	4	4,25	2,1
2	SFM4CHO	FMS3 (1)	0,90	37,2	40,55	11	4,45	3,9	2,9
3	Dynamis	Efficient Feed B+ (4) / FMS3 (1)	1,38	67,5	19,4	2,1	8,1	2,0	0,9
4	Dynamis	ActiCHO Feed (1,5)	1,58	70,8	16,6	1,3	8,1	1,7	1,7
5	Dynamis	BalanCD Feed2, (5) / FMS3 (1)	1,09	63,9	22,7	2,7	7,6	2,3	0,8
6	CellVento-200	ActiCHO Feed (1,5)	1,44	71,4	14,5	1,2	8,3	1,5	3,3
7	CellVento-210	BalanCD Feed2 (5) / FMS3 (1)	1,27	60,7	25,2	3,0	7,3	2,6	1,2

Примечание. Упоминание двух подпиток через косую черту означает их попеременное использование.

Footnote. Two feeds through slash mean their alternate use.

тательных сред и подпиток для культивирования клеток CHO в колбах можно в достаточно широких пределах изменять профиль гликанов рекомбинантных антител и добиваться требуемого результата, а также увеличивать продуктивность полученного клона-производителя.

Следует особо отметить, что наиболее эффективные комбинации состояли из сред и подпиток от разных производителей. Этот момент часто не учитывается разработчиками, в результате чего они упускают реальную возможность добиться существенного прогресса в производительности процесса культивирования и качестве целевого продукта.

ЛИТЕРАТУРА

- Baselga J., Norton L., Albanell J., et al. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res.*, 1998, 58(13), 2825–2831. doi: 10.1158/0008-5472
- Anderson D.R., Grillo-Lopez A., Varns C., et al. Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Biochem. Soc. Trans.*, 1997, 25(2), 705–708. doi: 10.1042/bst0250705
- Elliott M.J., Maini R.N., Feldmann M., et al. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet.*, 1994, 344(8930), 1105–1110. PMID: 7934491
- Broeder A.A., Joosten L.A., Saxne T., et al. Long term anti-tumour necrosis factor alpha monotherapy in rheumatoid arthritis: effect on radiological course and prognostic value of markers of cartilage turnover and endothelial activation. *Ann. Rheum. Dis.*, 2002, 61(4), 311–318. doi:10.1136/ard.61.4.311
- Malley R., DeVincenzo J., Ramilo O., et al. Reduction of respiratory syncytial virus (RSV) in tracheal aspirates in intubated infants by use of humanized monoclonal antibody to RSV F protein. *Infect. Dis.*, 1998, 178(6), 1555–1561. doi: 10.1086/314523
- Zhou W., Chen C.C., Buckland B., Aunins J. Fed-batch culture of recombinant NS0 myeloma cells with high monoclonal antibody production. *Biotechnol. Bioeng.*, 1997, 55(5), 783–792. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19970905)55:5<783::AID-BIT8-3.0.CO;2-7
- Papadakis K.A., Shaye O.A., Vasiliauskas E.A., et al. Safety and efficacy of adalimumab (D2E7) in Crohn's disease patients with an attenuated response to infliximab. *Gastroenterol.*, 2005, 100(1), 75–79. doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.40647.x
- Elliott M.J., Maini R.N., Feldmann M., et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum.*, 1993, 36(12), 1681–1690. doi: 10.1002/art.23362
- Decker T., Lohmann-Matthes M.L., and Gifford G.E. Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. *Immunol.*, 1987, 138, 957–962. doi:138(3):957-62
- Mitoma H., Horiuchi T., Tsukamoto H., et al. Mechanisms for cytotoxic effects of anti-tumor necrosis factor agents on transmembrane tumor necrosis factor alpha-expressing cells:

- comparison among infliximab, etanercept, and adalimumab. *Arthritis Rheum.*, 2008, 58(5), 1248–1257. doi: 10.1002/art.23447
11. Jefferis R. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol. Prog.*, 2005, 21(1), 11–16. doi:10.1021/bp040016j
 12. Jefferis R., Lund J., and Pound J.D. IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunol. Rev.*, 1998, 163, 59–76. doi: 10.1111/j.1600-065X.1998.tb01188.x
 13. Arnold J.N., Wormald M.R., Sim R.B., et al. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Ann. Rev Immunol.*, 2007, 25, 21–50. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702
 14. Shinkawa T., Nakamura K., Yamane N., et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biol. Chem.*, 2003, 278, 3466–3473. doi: 10.1074/jbc.M113.502542
 15. Boyd P.N., Lines A.C., and Patel A.K. The effect of the removal of sialic acid, galactose and total carbohydrate on the functional activity of Campath-1H. *Mol. Immunol.*, 1995, 32 (17-18), 1311–1318. PMID: 8643100.
 16. Raju T.S. Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Curr. Opin. Immunol.*, 2008, 20(4), 471–478. doi: 10.1016/j.coi.2008.06.007
 17. Karsten, C.M., Pandey, M.K., Figge, J.J., et al. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcR1IB and dectin-1. *Nat. Med.*, 2012, 18, 1401–1406. doi: 10.1038/nm.2862
 18. Kaneko Y., Nimmerjahn, F., and Ravetch J.V. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 2006, 313(5787), 670–673. doi: 10.1126/science.1129594
 19. Wright A., Sato Y., Okada T., et al. *In vivo* trafficking and catabolism of IgG1 antibodies with Fc associated carbohydrates of differing structure. *Glycobiolog.*, 2000 10(12), 1347–1355. doi: 10.1093/glycob/10.12.1347
 20. Gramer M.J., Eckblad J.J., Donahue R., et al. Modulation of antibody galactosylation through feeding of uridine, manganese chloride, and galactose. *Biotechnol. Bioeng.*, 2011, 108(7), 1591–1602. doi: 10.1002/bit.23075
 21. Savinova I.N., Lobanova N.V., Bykova N.N., et al. Efficiency of CHO cell culture supplementation with fatty acids, N-acetyl-D-mannosamine and N-acetylneuraminic acid for modification of recombinant darbepoetin alpha sialylation. *Biotechnologiya*, 2015, 31, (1), 22–28.
 22. Huang C.J., Lin H., and Yang J.X. A robust method for increasing Fc glycan high mannose level of recombinant antibodies. *Biotechnol. Bioeng.*, 2015, 112(6), 1200–1209. doi: 10.1002/bit.25534
 23. Ahn W.S., Jeon J.J., Jeong Y.R., et al. Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 2008, 101(6), 1234–1244. doi: 10.1002/bit.22006
 24. Yoon S.K., Choi S.L., Song J.Y., and Lee G.M. Effect of culture pH on erythropoietin production by Chinese hamster ovary cells grown in suspension at 32.5 and 37.0 degrees. *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, 89(3), 345–356. doi: 10.1002/bit.20353
 25. Chusainow J., Yang Y.S., Yeo J.H., et al. A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: what makes a stable high producer? *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, 102(4), 1182–96. doi: 10.1002/bit.22158

Optimization of Medium Composition for Cultivation of CHO Line Cells Producing Adalimumab Monoclonal Antibody to Tumor Necrosis Factor Alfa

E.V. VORONINA^{1,*}, N.V. LOBANOVA¹, A.V. SUKHOZHENKO², A.A. KLISHIN¹, I.N. SAVINOVA¹, and Yu.A. SERYOGIN¹

¹The Limited Liability Company “Pharmapark”, 117246, Moscow Russia

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

*e-mail: voronina@pharmapark.ru

Received May 25, 2016

Accepted August 2, 2016

Abstract – A strategy for optimization of the glycosylation profile of Adalimumab, a monoclonal antibody to TNF α produced by CHO culture has been described. Adalimumab is an analog of a monoclonal antibody that serves as a substance of the Humira preparation, a product of Abbot GmbH & Co. KG (USA). Culturing in a closed volume with periodical feed addition (fed-batch regime) was the basis of the developed technology. A great number of media and feeds from various manufacturers were tested. All of them contained no components of animal origin and supported the CHO cell line suspension cultivation. The analysis of separated from the antibody oligosaccharides and their comparison with the original preparation were performed by chromatomass-spectrometry. Three lots of the obtained

preparation were analyzed, and it was shown that they all contained the typical glycans for antibodies produced by the CHO cells: the complex fucosylated G0F/G1F/G2F and nonfucosylated G0/G1 forms, and also glycans with 5 mannose residues (Man5). The ratio of glycans was also typical for antibodies obtained by CHO cells culturing: the predominating forms contained fucose rather than galactose. Based on the analysis of the glycosylation profile and data on antibody productivity, a combination of Dynamis (Gibco, USA) medium and ActiCHOA/B (GE Healthcare, Austria) feed that provided the antibody productivity of 1.58 g/L during fed-batch culturing was selected for the further investigation. It was established that the galactose (19.6% in the obtained *versus* 23.5% in the original preparation) and fucose (85.7% versus 88.7%) content were similar in both preparations, i.e. the amounts of main glycans and monosaccharides as their components are close to the desired status. The significant difference was only observed in the content of a minor glycan, Man5 (1.7% versus 6.3%). The importance of those differences can be assessed in two ways: on one hand, they are beyond the permissible limits of variability of the original preparation; on the other, they were observed at an early stage of the technology, during a small-volume culturing.

Key words: CHO cells, cultivation, glycosylation, optimization.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-6-60-67