

УДК 602.6:612

Адаптация клеточной линии, производящей моноклональное антитело, к условиям культивирования в биореакторе с механическим перемешивающим элементом

© 2018 Н.В. ЛОБАНОВА^{1,*}, Е.В. ВОРОНИНА², А.А. НУРБАКОВ², А.А. КЛИШИН¹, Ю.А. СЕРЕГИН¹

¹ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»–ГосНИИгенетика), Москва, 117545

²Общество с ограниченной ответственностью «ФАРМАПАРК», Москва, 117246

*e-mail: nataliya.lobanova383@gmail.com

Поступила 01.10.2018 г.

После исправления 01.11.2018 г.

Принята в печать 15.12.2018 г.

С помощью постепенной двухступенчатой адаптации к условиям культивирования в биореакторе удалось селективировать нечувствительную к механическому воздействию субпопуляцию клеток СНО, производящую моноклональное антитело субкласса IgG1. Методом предельных разведений отобран клон адаптированных клеток, для которого подтверждена стабильность продукции целевого белка, проведена оптимизация и масштабирование процесса культивирования. Показано, что отобранный клон способен расти в биореакторе с сохранением ключевых параметров роста, при этом в сравнении с неадаптированными клетками достигнуто увеличение максимальной клеточной плотности в 3,5 раза, длительности процесса – на 4 дня и продуктивности – примерно в 9 раз.

Ключевые слова: клетки СНО, моноклональное антитело, культивирование, биореактор, адаптация, лактат, стресс

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-6-80-94

Производство терапевтических моноклональных антител (моноАТ) – один из наиболее быстро развивающихся сегментов современной биотехнологии [1–3]. моноАТ применяют для лечения широкого спектра заболеваний: онкологических [4, 5], аутоиммунных [6, 7] и вирусных [8]. Абсолютное большинство моноАТ производятся в суспензионных клетках яичников китайского хомячка (СНО) [9–11], однако довольно часто также используются клетки мышинной миеломы Sp2/0 [5, 9] и NS0 [12, 13].

Поскольку моноАТ применяются в высоких дозировках (десятки и сотни миллиграмм на дозу), для их производства используются большие биореакторы STR (Stirred Tank Reactors) с механическими перемешивающими элементами. Они

обеспечивают более простое масштабирование, чем биореакторы других конструкций, например волновые. Кроме того, в них проще достичь высокой эффективности массообмена в объемах более 100–200 л [11, 14, 15].

Основной недостаток биореакторов STR-типа – довольно жесткое механическое воздействие на клетки со стороны лопастей мешалки и пузырьков воздуха, прикрепляющихся к клеткам и создающих локальные перепады давления вблизи них [16–18]. Лопание пузырьков на границе раздела двух фаз – жидкости и газа – вызывает у клеток сильный стресс, вплоть до их лизиса [19–21].

Для минимизации негативных эффектов в работе биореакторов используют особый тип мешалки со скоростью вращения, обеспечивающей

Список сокращений: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ДМСО – диметилсульфоксид; ИФА – иммуноферментный анализ; КЖ – культуральная жидкость; КП – клеточная плотность; моноАТ – моноклональное антитело; СНО – клетки яичников китайского хомячка (Chinese Hamster Ovary); SDS-ПААГ-электрофорез – электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия; STR – Stirred Tank Reactor.

эффективное и малотравматичное перемешивание. Так, наиболее подходящей для эукариотических клеток считается мешалка «морской винт» [18, 20]. Действенным способом снижения стресса клеток при перемешивании служит добавление в среду протекторов на основе детергентов, таких как Pluronic F-68 [17]. Pluronic F-68 (другие торговые названия Poloxamer 188, Kollifor P 188) представляет собой полимер, состоящий из трех мономерных блоков. Он обеспечивает снижение поверхностного натяжения на границе раздела фаз жидкость–газ, что уменьшает взаимодействие между клетками и пузырьками воздуха/кислорода, и тем самым защищает клетки от механического стресса [22, 23].

В литературе описаны также и другие стратегии для минимизации влияния стрессора на клетку: подача газов через поверхность культуральной жидкости (КЖ), использование биореакторов классической цилиндрической формы, но без механических мешалок, каскадная регуляция скорости перемешивания и подачи газов, выбор размера пузырьков [11, 24]. В большинстве случаев эти подходы позволяют решить проблему или, если условия эксперимента позволяют, клеточные линии заменяют культурами, более устойчивыми к стрессу.

Однако существуют клеточные линии, особенно чувствительные к гидродинамическому стрессу, и стандартные способы его минимизации для них неэффективны. Ситуация осложняется, в случае, когда использование таких клеточных линий крайне оправданно, например по показателям продуктивности или качеству производимого белка.

В настоящем исследовании была использована суспензионная клеточная линия СНО, продуцент моноклонального антитела субкласса IgG1. Она обладала повышенной чувствительностью к гидродинамическому стрессу: при ее культивировании в биореакторах разных типов отмечалось производство высоких концентраций лактата, низкая скорость роста и быстрое падение жизнеспособности. Данные свойства малопригодны для промышленного производства. Для решения проблемы предложено использовать обратную стратегию – не подбор условий культивирования под клеточную линию, а адаптацию клеток к стрессовым факторам, возникающим в биореакторе STR-типа.

Цель настоящего исследования – адаптация клеточной линии СНО к гидродинамическому стрессу в процессе культивирования в STR-био-

реакторе с последующим отбором высокопродуктивных клонов из адаптированных клеток и оптимизацией их культивирования.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Получение клона-продуцента

Клон А26 был получен трансфецированием генетических конструкций, содержащих гены легкой и тяжелой цепи моноАТ, в клетки суспензионной линии СНО-S (Invitrogen, США). Для отбора стабильных клеточных линий использовался метод предельных разведений. Для создания клеточной линии использовалась схема, аналогичная описанной для клеток линии СНО-S в работе [25].

Размораживание клеток

Оттаивание клеточной суспензии осуществляли в водяной бане при температуре 37 °С. Полностью размороженную суспензию клеток отмывали от криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) центрифугированием в среде BalanCD Growth A (Irvine Scientific, США) в течение 5 мин при 200× g и комнатной температуре. Осадок клеток суспендировали в 5 мл культуральной среды BalanCD Growth A, содержащей 4 мМ аланил-глутамин (Life Technologies), и переносили во флакон площадью 25 см², культивировали в течение 1-2 сут при температуре 37 °С и 5%-ном содержании CO₂.

Замораживание клеток

Клеточную суспензию с плотностью (3–6)·10⁶ кл./мл центрифугировали в течение 5 мин при 200×g и комнатной температуре. Клеточный осадок ресуспендировали в среде для замораживания – BalanCD Growth A с добавлением 10% ДМСО – до плотности 5,0·10⁶ кл./мл и разливали по 1,0 мл в криобирки объемом 1,2 мл. Криобирки инкубировали при температуре –80 °С в течение 24 ч и далее помещали в криохранилище на долгосрочное хранение при температуре жидкого азота (–196 °С).

Культивирование клеток

Стационарное культивирование осуществляли в планшетах, помещенных в CO₂-инкубатор при температуре 37 °С, содержании CO₂ 5% и влажности 90%. Посевная плотность составляла 0,3·10⁶ кл./мл, объем культивирования для 96-луночных планшетов составлял 100–200 мкл, для 24-луночных – 400–500 мкл, для 6-луночных – 1-2 мл. Использовали бессывороточную

питательную среду BalanCD Growth A (Irvine Scientific, США), с добавлением 4 мМ аланил-глутамина (Life Technologies).

Культивирование с перемешиванием проводили в колбах Эрленмейера объемом 125 мл (Corning, США) на шейкере в CO₂-инкубаторе Multitron Cell (Infors, Швейцария) с частотой вращения 125 об/мин в атмосфере 5% CO₂, при температуре 37 °С и влажности 75%. Пересев клеток осуществляли каждые 2-3 дня до плотности 0,3·10⁶ кл./мл, объем культивирования составлял 20–25 мл. Использовали бессывороточную питательную среду BalanCD Growth A (Irvine Scientific), с добавлением 4 мМ аланил-глутамина (Life Technologies).

Характеристика клеток

Подсчет числа клеток и анализ их жизнеспособности осуществляли после окрашивания трипановым синим (Panreac, Испания) на счетчике клеток TC10 (Bio-Rad, США) с использованием одноразовых слайдов

Для оценки продуктивности использовали три параметра: скорость роста, время удвоения клеток, специфическую (удельную) продуктивность.

Скорость роста (μ) рассчитывали по следующей формуле:

$$\mu = (\ln N_H - \ln N_I) / (t_H - t_I),$$

где N_H – общее число жизнеспособных клеток на момент измерения; N_I – общее число инокулированных жизнеспособных клеток; t_H – время измерения; t_I – время инокуляции.

Время удвоения клеток (T) рассчитывали согласно формуле:

$$T = \ln(2) / \mu$$

Специфическую (удельную) продуктивность – pcd (пг/кл. день) оценивали за определенный интервал времени роста клеток, используя формулу:

$$pcd = \frac{P_n - P_0}{n} \cdot \frac{\ln(CD_n / CD_0)}{CD_n - CD_0},$$

где P_0 и P_n – концентрации целевого белка в КЖ в начальный момент (при засеве) и на последний день культивирования [26], CD_0 и CD_n – клеточная плотность при засеве и на последний день культивирования

Приготовление инокулята клеток

Инокулят для засева биореакторов осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 250 мл (Corning) на шейкере-CO₂-инкубаторе Multitron

Cell (Infors) с частотой вращения 125 об/мин в атмосфере 5% CO₂, при температуре 37 °С и влажности 75%. Посевная плотность составляла 0,5·10⁶ клеток/мл, объем культивирования – 50 мл, наращивание клеток проводили в течение 3–4 сут. Объем инокулята составлял 1/10 часть от объема культивирования в засеваемом биореакторе.

Продукция целевого белка

Работу проводили в двух биореакторах: стеклянном автоклавированном биореакторе Applikon с сосудами объемом 3 и 7 л (рабочий объем 1–2 и 3–5 л, соответственно) и волновом биореакторе Appliflex (рабочий объем 3–5 л). Использовались следующие параметры процесса (если не указано иного): температура 37±1 °С, концентрация растворенного кислорода 50±10%, pH 7,1±0,2. В биореакторе Applikon перемешивание осуществлялось мешалкой типа «морской винт» диаметром 100 мм, скорость вращения мешалки составляла 70–90 об/мин. В биореакторе Appliflex перемешивание клеточной суспензии в одноразовом мешке проводили с помощью качаний платформы с частотой 25 раз/мин и углом наклона 8°. Для аэрации в биореакторе Applikon использовали барботер с размером отверстий 1 мм, скорость потока газов составляла до 1 л/мин. Для аэрации в биореакторе Appliflex применяли подачу смеси газов в воздушное пространство над жидкостью со скоростью 0,2–0,5 л/мин. Регуляцию pH во всех случаях осуществляли в автоматическом режиме с помощью подачи углекислого газа и 0,5 М бикарбоната натрия.

В культивировании использовалась среда BalanCD Growth A, в которую добавляли по 5% подпитки BalanCD CHO Feed 2 (Irvine Scientific) на третий и все последующие дни. Начиная с 3-го дня, ежедневно осуществляли подсчет клеток на автоматическом счетчике, проводили измерение концентрации глюкозы и лактата в культуральной жидкости с помощью анализатора Accutrend Plus в комплекте с тест-полосками (Roche, Швейцария). При снижении в КЖ уровня глюкозы менее 2 г/л концентрацию ее доводили до 5 г/л с помощью раствора глюкозы 200 г/л.

Адаптация клеток к биореактору

Процесс адаптации проходил в течение двух циклов культивирования. Объем заполнения сосуда в каждом цикле составлял 0,8 (в начале процесса) и 1,0 л (после добавления подпиток).

В первом цикле клеточную линию A26 заседали в сосуд объемом 3 л биореактора Applikon исходной клеточной плотностью 1,5·10⁶ кл./мл в 1 л

питательной среды BalanCD Growth A, содержащей 5 мг/л селективного антибиотика бластицидина (Life Technologies). В первые сутки культивирования устанавливали скорость вращения мешалки 80 об/мин, которую затем повышали каждые 2 сут на 20 об/мин и доводили до 160 об/мин. На 9-е сутки при снижении жизнеспособности клеток менее 80% культивирование останавливали. Культуру клеток из биореактора отсеивали в колбу объемом 125 мл и продолжали культивирование с селективным антибиотиком в течение трех пассажей до достижения жизнеспособности более 95%. Полученную культуру использовали для второго цикла адаптации.

Исходные условия были аналогичны первому циклу адаптации, за исключением скорости перемешивания, которую устанавливали на 120 об/мин и повышали на 30 об/мин каждые 2 сут до достижения 240 об/мин на 8-е сутки. На 10-е сутки культивирования жизнеспособность клеток снизилась до 83%, и культивирование было остановлено. Жизнеспособность культуры восстанавливали в колбах с антибиотиком, как описано выше. Адаптированной культуре присвоили наименование A26a. Клетки замораживали в среде BalanCD Growth A, содержащей 5 мг/л бластицидина и 10% ДМСО.

Отбор клонов

Для отбора клонов адаптированных клеток использовали метод предельных разведений в 96-луночных планшетах. За одни сутки до проведения предельных разведений клетки клона A26a засеивали в колбу объемом 250 мл в клеточной плотности $0,4 \cdot 10^6$ кл./мл. Готовили суспензию клеток с плотностью 2,5 кл./мл в среде следующего состава: среда BalanCD Growth A с 5 мг/л бластицидина и 2 г/л рекомбинантного альбумина человека (Sigma, США), содержащая 20% кондиционированной среды (среда после суточного роста клеток, полученная центрифугированием клеточной суспензии при $500 \times g$ и последующей фильтрации супернатанта через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм). Суспензию разливали по 0,2 мл в лунки 96-луночных планшетов в конечной концентрации 0,5 кл./лунку. Всего было использовано 40 планшетов. Планшеты помещали в CO_2 -инкубатор для культивирования в атмосфере 5% CO_2 при температуре 37 °C и влажности 95% в течение 20–25 сут. Начиная с 10-х суток контролировали рост клеток в лунках под микроскопом СКХ-41 (Olympus, Япония), отмечая лунки, в которых наблюдался рост от одной клетки. По достижении 80–100% конfluence индивидуальными клонами переносили в новые 96-луночные планшеты. Через 5 сут

анализировали пробы КЖ на наличие антитела методом ИФА. Клоны, показавшие наибольшую продуктивность при культивировании в 96-луночных планшетах, последовательно переносили в 24-луночные планшеты с 500 мкл селективной среды и затем в 6-луночные планшеты с 1 мл среды и культивировали в течение 4–5 сут во обоих случаях. Далее клоны переносили в колбы объемом 125 мл для суспензионного культивирования.

Адаптация клеток к новым средам

В день очередного субкультивирования переносили суспензию клеток в смесь равных объемов старой и новой среды в плотности $0,5 \cdot 10^6$ кл./мл. На следующем пассаже переносили суспензию полностью в новую среду в такой же плотности. После этого проводили не менее четырех пассажей в новой среде с плотностью засева $0,3 \cdot 10^6$ кл./мл до стабилизации времени удвоения. Такая схема адаптации позволяла поддерживать высокую жизнеспособность культуры.

Цикл культивирования (ОК) в колбах с подпитками

В экспериментах использовали среду SFM4CHO и набор подпиток CellBoost (CB) (HyClone, США), подпитки FMS3 и U-feeds (Amimed, Швейцария), среду ActiCHO SM и набор подпиток ActiCHO Feed A/B (ACFA+ACFB) (GE Healthcare, США), среду CellVento 210 с набором подпиток CellVento Feed-210 и Cys/Typ (Merck, США), среду Ex-Cell с подпиткой Ex-Cell Feed (Sigma), подпитки EfficientFeed C (EFC) (Life Technologies) и BalanCD Feed 2 (BF2).

Цикл осуществляли в колбах объемом 125 мл и установках шейкера- CO_2 -инкубатора, указанных выше. Ежедневно, начиная с 3-го дня, определяли клеточную плотность и жизнеспособность и измеряли концентрацию глюкозы в культуральной жидкости с помощью анализатора Accutrend Plus (Roche). 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%. Оценку концентрации антитела в КЖ осуществляли с помощью набора для иммуноферментного анализа (ИФА) «Seramun Human IgG kit» (Serazyme, Германия).

SDS-ПААГ-электрофорез

В восстанавливающих условиях проводили SDS-ПААГ-электрофорез образцов КЖ, отобранных на последние сутки культивирования

в STR-биореакторе. Для получения электрофореграммы использовали стандартную методику Лэммли, 12,5%-ный ПААГ с последующим окрашиванием Кумасси-R250.

Получение и анализ гликанов антител

Для анализа гликанов антител использовали элюаты, полученные в результате очистки КЖ на аффинном сорбенте MabSelect SuRe LX (GE Healthcare, США). Элюаты обессоливали, после чего проводили дегликозилирование антител с помощью N-гликозидазы F (Roche). Отщепленные гликаны предварительно разделяли на колонке с сорбентом YMC-Triart Diol-HILIC (YMC, Япония), подключенной к хроматографу 1260 Infinity (Agilent, США). Гликаны подвергали электрораспылительной ионизации с разделением и детекцией получившихся ионов в масс-анализаторе Bruker Maxis Impact (QqTOF, Германия). Обработку данных проводили в программе Bruker Data Analysis 4.1.

Анализ заряженных форм антитела осуществляли методом обращено-фазовой ВЭЖХ на системе UltiMate 3000 (Dionex, США) с использованием ионообменной колонки YMC-BioPro (YMC). Анализ проводили при температуре 25 °С, элюирующиеся с колонки компоненты детектировали с помощью УФ-детектора при длине волны 280 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рост или гибель клеточных линий на основе СНО всегда зависит в той или иной степени от механического воздействия на клетки [16, 20]. Приведем конкретные примеры излишней клеточной чувствительности.

Клеточная линия A26, экспрессирующая моноАТ, обладала оптимальной для клеток СНО скоростью роста в колбах (время удвоения составляло 22 ± 3 ч). На подобранной комбинации среды и подпитки (BalanCD Growth A и BalanCD Feed 2) максимальная клеточная плотность достигала $16,7 \cdot 10^6$ кл./мл на 6–8 сут (рис. 1а), при этом общая продуктивность, определенная методом ИФА, составляла 0,6 г/л среды. Однако при культивировании в биореакторах разных типов отклонения от этих показателей были значительными.

На рис. 1а приведена типичная кривая роста клеток в стеклянном биореакторе STR-типа. Первые 2–3 дня клетки демонстрировали выраженную лаг-фазу. С 4-го по 7-й дни наблюдался активный рост клеток и потребление ими питательных веществ, что сопровождалось при этом выработкой сравнительно большого количества лактата (до 4,2 г/л), (рис. 1б). Данный факт обуславливал торможение клеточного роста из-за сопутствующего повышения осмолярности среды. В волновом биореакторе наблюдалось аналогичное поведение клеток, за исключением лаг-фазы, которая была менее выражена (данные не приведены). Представляет интерес тот факт, что жизнеспособность клеток в биореакторах практически не отличалась от таковой в колбах на соответствующий день культивирования. Из этого наблюдения можно сделать вывод, что условия культивирования в биореакторах являются хоть и не оптимальными, но вполне переносимыми для клеток.

В ходе дальнейших экспериментов в биореакторах разных типов не удалось существенно улучшить характер роста культуры. При этом

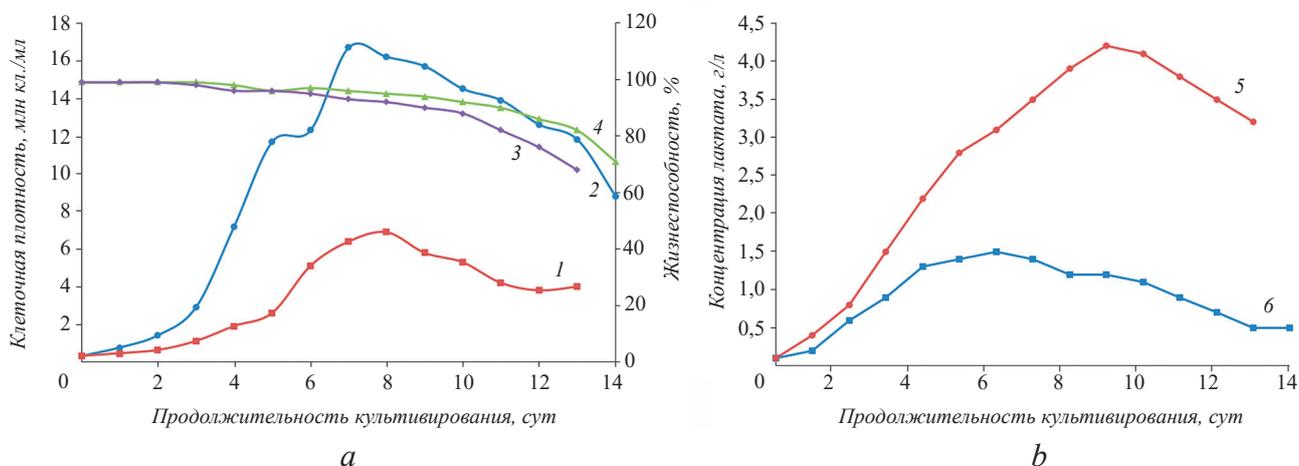


Рис. 1. Анализ ростовых характеристик (а) и выработки лактата (б) клетками линии A26 при культивировании в стеклянном биореакторе STR-типа (кривые 1, 3, 5) и в колбах (кривые 2, 4, 6)

Fig. 1. Growth characteristics (a) and lactate production (b) by cell line A26 under STR bioreactor (curves 1, 3, 5) and shake-flask cultivation (curves 2, 4, 6)

оставались неясными причины такого различия в поведении клеток и влияющие на него факторы. Существенным являлся тот момент, что продуктивность процессов в биореакторах была в 4–8 раз ниже, чем в колбах (не более 0,1 г/л по данным ИФА). В связи с этим технология культивирования с такими характеристиками роста и продуктивности клеточной линии в промышленном производстве оказывалась нерентабельной.

Следует отметить, что за время использования STR-биореакторов для культивирования разных суспензионных клеточных линий на основе СНО подобное поведение клеточных линий отмечалось авторами впервые [27]. Вероятнее всего, оно диктовалось именно свойствами клеточной линии, а не настройками биореакторов или параметрами процессов, которые были вполне стандартными.

Исходя из полученных результатов, было выдвинуто предположение, что критичным для клеточной линии A26 мог быть характер перемешивания в биореакторе и возникающие при этом гидродинамические нагрузки на клетки. Поскольку чувствительная к подобного рода нагрузкам клеточная линия A26, не подходила для эффективного и рентабельного промышленного производства, но при этом обеспечивала хороший выход целевого продукта в колбах, было решено провести ее доработку.

Идея заключалась в том, чтобы воспользоваться природной изменчивостью клеток СНО [28, 29] и провести их адаптацию непосредственно в ходе культивирования в биореакторе. Поскольку предполагалось, что главным стрессовым фактором для клеток является механическое воздействие мешалки, то скорость ее вращения в процессе культивирования увеличивали постепенно, а снижение жизнеспособности клеток постоянно контролировали. Другой возможный травмирующий фактор – пузырьки газов, которые всегда присутствуют в процессе культивирования в большом количестве, поэтому увеличивать интенсивность подачи газов в биореактор в проводимых экспериментах посчитали нецелесообразным.

Адаптация клеток к перемешиванию в биореакторе типа STR

Было проведено два последовательных процесса культивирования в биореакторе Applikon с сосудом объемом 3 л на среде BalanCD Growth A с подпиткой BalanCD Feed 2. Процессы культивирования имели некоторые принципиальные особенности, которые учитывали повышенную чувствительностью клеток к гидродинамическому стрессу и быстрое снижение жизнеспособности.

Большая скорость роста клеток в условиях селективного давления не ожидалась, поэтому клеточная плотность при засеве составляла $(1,0–2,0) \cdot 10^6$ кл./мл. Начало обоих процессов адаптации характеризовалось шадящими в плане гидродинамического стресса для клеток настройками биореактора – минимальная скорость перемешивания (60 об/мин – в 1-м процессе, 120 об/мин – во 2-м процессе), аэрация чистым кислородом, которая меньше всего травмирует клетки, барботер с крупными отверстиями. Затем скорость перемешивания повышали таким образом, чтобы жизнеспособность клеток достигла уровня $85 \pm 5\%$. После снижения жизнеспособности ниже 70% процесс останавливали. В обоих процессах использовалась питательная среда BalanCD Growth A со сниженной концентрацией глюкозы (5 г/л вместо 10 г/л), чтобы уменьшить продукцию лактата. Важным фактом также являлось сохранение продуктивности клеточной линии, для этой цели в среду добавлялся селективный антибиотик, бластицидин, в концентрации 5 мг/л. Кривые роста клеток и их жизнеспособности в ходе двух раундов адаптации представлены на рис. 2.

Первый процесс культивирования был остановлен на 9-е сут при скорости перемешивания 160 об/мин. Жизнеспособность клеток от начального уровня 97% снизилась к концу процесса до 64%, что говорит об эффективной селекции при скорости перемешивания 140–160 об/мин (рис. 2a). После завершения первого процесса адаптации клетки из биореактора перенесли в колбы объемом 125 мл и культивировали в течение пяти пассажей, до того момента, пока их жизнеспособность не повысилась до 95%. В процессе восстановления жизнеспособности клеток использовали питательную среду с 5 мг/л бластицидина для поддержания продуктивности. Восстановленные в колбах клетки использовали во втором процессе адаптации в биореакторе в тех же условиях.

Второй процесс был начат при скорости перемешивания 120 об/мин и продолжался в течение 10 сут, максимальная скорость в конце культивирования составила 240 об/мин. Несмотря на более высокую скорость перемешивания, в течение всего процесса скорость роста клеток, клеточная плотность и жизнеспособность были выше таковых в первом раунде адаптации (рис. 2b). По наблюдаемому поведению клеток было видно, что первый процесс адаптации в биореакторе был решающим, и селекция клеток прошла успешно. Поэтому при скорости 240 об/мин процесс был остановлен, не дожидаясь снижения жизнеспособности, поскольку достигнутая скорость перемешивания

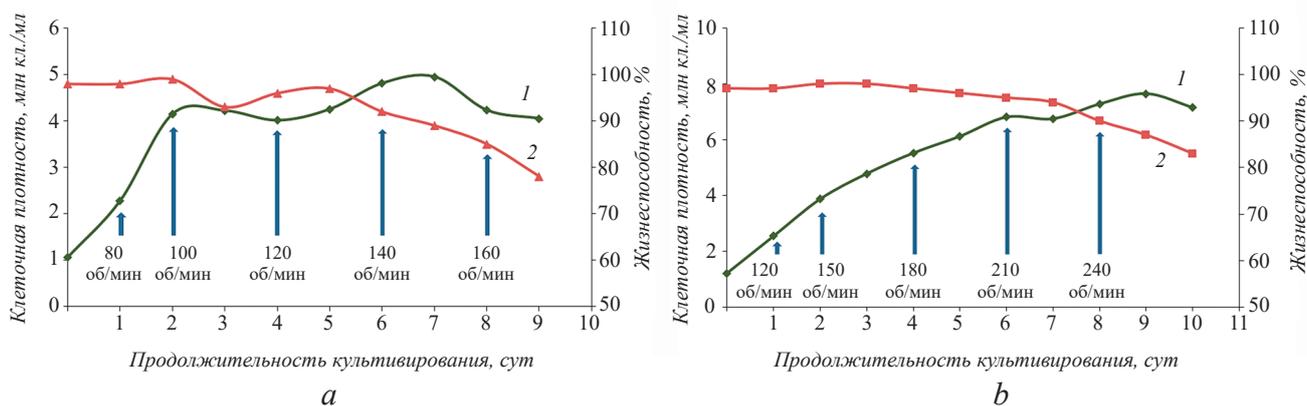


Рис. 2. Показатели адаптации клеточной линии A26 к культивированию в биореакторе STR-типа: *a* – первый цикл, *b* – второй цикл адаптации. 1 – кривая роста; 2 – кривая жизнеспособности

Fig. 2. Performance of A26 cell line adaptation to STR bioreactor cultivation: *a* – first cycle, *b* – second cycle. 1 – growth curve, *b* – viability

была более чем достаточна для последующих процессов культивирования. Клетки из биореактора были перенесены в колбы, где культивировались в течение двух пассажей до восстановления жизнеспособности выше 95%, после чего из них был приготовлен клеточный банк. Адаптированные к условиям перемешивания в реакторе клетки получили наименование A26а.

Таким образом, после двух циклов адаптации из исходной клеточной линии был отобран пул клеток, предположительно, выдерживающий высокие гидродинамические нагрузки. Безусловно, он отличался от исходной клеточной линии как фенотипически, так и генетически. Необходимо было сравнить основные параметры клеточной линии до и после адаптации: культуральные характеристики,

включая чувствительность к перемешиванию, а также удельную продуктивность в расчете на клетку.

Все эти параметры исследовали путем одновременного культивирования исходной и результирующей (адаптированной) клеточной линии в колбах объемом 125 мл и в биореакторе со стеклянным сосудом объемом 3 л (объем наполнения 1,5 л). При этом в биореакторе устанавливали постоянную скорость вращения мешалки 150 об/мин. Другие параметры проведения процессов (состав среды, схема внесения подпитки, pH, концентрация растворенного кислорода) были идентичны таковым в ранее проводимых процессах культивирования.

Кривые роста адаптированных клеток в колбах и биореакторе в сравнении с контрольной культурой без адаптации приведены на рис. 3.

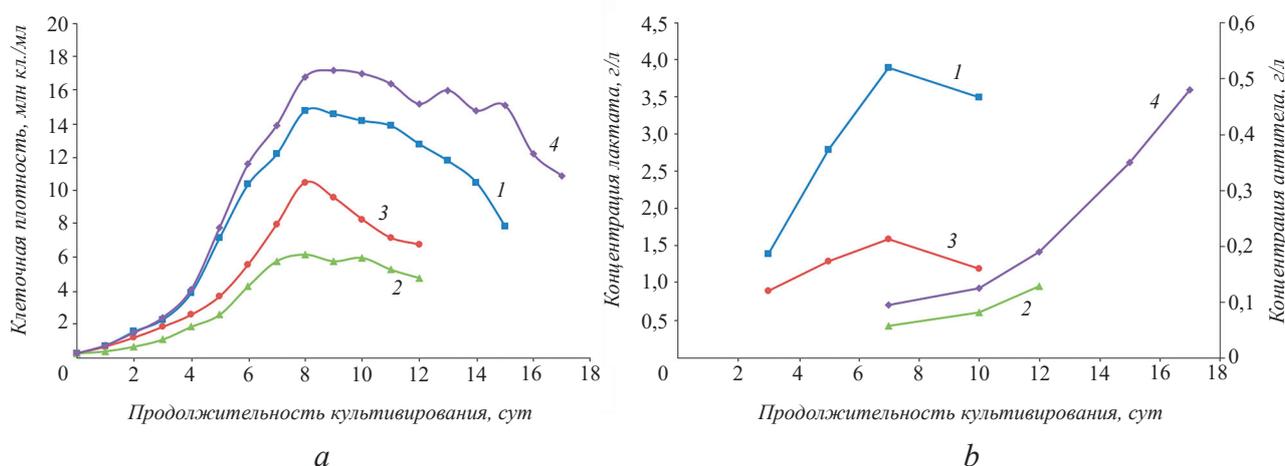


Рис. 3. Сравнение основных параметров исходной (A26) и адаптированной (A26а) клеточных линий. *a* – кривые роста линий A26 (1, 3) и A26а (2, 4) при культивировании в колбах (1, 2) и в стеклянном биореакторе (3, 4); *b* – накопление лактата (1, 3) и целевого продукта (2, 4) при культивировании в биореакторе линий A26 (1, 2) и A26а (3, 4)

Fig. 3. Comparison of basic parameters of origin (A26) and adapted (A26a) cell lines. *a* – growth curves of A26 (1, 3) and A26a (2, 4) cell lines under shake-flask (1, 2) and STR cultivation (3, 4); *b* – lactate accumulation (1, 3) and aim protein production (2, 4) during STR cultivation of A26 (1, 2) and A26a (3, 4) cell lines

Как видно из рис. 3а, при культивировании в колбах адаптированная клеточная линия А26а обладает худшими культуральными характеристиками. Рассчитанная для линии А26а удельная продуктивность на клетку, в сравнении с исходной клеточной линией А26, оказалась меньше.

При этом, произошло значительное улучшение ростовых характеристик при культивировании в биореакторе: продолжительность процесса для клона А26а составила 17 сут, максимальная клеточная плотность – 17,2 млн кл./мл. Уровень лактата на 7-е сутки в биореакторе для адаптированной клеточной линии оказался в 3,6 раза ниже, чем для неадаптированных клеток (1,6 г/л против 3,9 г/л, соответственно) (рис. 3б). В итоге, общая продуктивность процесса в биореакторе составила 0,5 г/л среды, что сопоставимо с продуктивностью, ранее получаемой для клона А26 в колбах.

По итогам проведенного эксперимента можно заключить, что использование адаптированной клеточной линии в производстве целевого антитела является оправданным.

Реклонирование адаптированных клеток

Важной характеристикой производственной клеточной линии, помимо высокой скорости роста и продуктивности, является стабильность экспрессии целевого белка. Для ее достижения был запланирован следующий этап исследования – реклонирование адаптированных клеток.

Как было показано выше, клеточная линия А26а имела более низкую удельную продуктивность, чем исходная клеточная линия А26. По-видимому, это объясняется тем, что в процессе адаптации с ней произошли разнонаправленные генетические и фенотипические изменения, и клетки А26а на самом деле являлись не гомогенной линией, а пулом клеток с широким диапазоном параметров. Поэтому для дальнейшего повышения продуктивности было решено провести повторное клонирование клеток А26а методом лимитирующих (предельных) разведений.

На первом этапе клонирования клетки росли в 96-луночных планшетах в течение 17 сут, по истечении которых было обнаружено 64 колонии. Каждая колония представляла собой потомков от одной клетки, попавшей в лунку планшета. Для 64 выросших клонов был проведен первичный скрининг на продуктивность с помощью ИФА (данные не приведены), по результатам которого продукция целевого антитела была зафиксирована у 47 клонов. Эти клоны подвергались масштабированию каждые 4–6 сут посредством

последовательного пересева в 24-луночные, затем 6-луночные планшеты и далее во флаконы площадью 25 см². Через 4 и 7 сут роста клеток в культуральных флаконах были проведены еще две стадии скрининга с помощью ИФА (данные не приведены), в результате которых 15 субклонов были перенесены в колбы объемом 125 мл.

Культивирование в колбах происходило в течение 4 пассажей, на 4-м пассаже клетки были засеяны в колбы в плотности 0,3 млн кл./мл для проведения цикла продукции в замкнутом объеме без подпиток (batch-культивирование) в течение 4 сут. Такой формат эксперимента является удобным инструментом для оперативной оценки продуктивных свойств свежесобранных клонов [25]. Данные по продуктивности на 4-е сутки эксперимента в колбах, а также по времени удвоения клеток приведены в табл. 1.

По результатам проведенного эксперимента было отобрано семь лидирующих вариантов клонов, обладающих оптимальной совокупностью характеристик – временем удвоения не более 25 ч и уровнем продукции антитела не менее 5 мг/л. Для выбранных клонов был проведен цикл продукции в колбах объемом 125 мл в формате fed-batch (культивирование в замкнутом объеме с подпиткой). Была использована среда BalanCD Growth A с добавлением подпитки BalanCD Feed 2: на 3, 5, 7-е сутки по 5%, на 9, 11, 13-е – по 10%, глюкоза в среде поддерживалась на уровне 5 г/л.

Результаты fed-batch-культивирования в колбах приведены в табл. 1 и на рис. 4. Было показано, что максимальную продуктивность обеспечивают клоны В8 и В27. При этом клон В8 обладал более высокой скоростью роста и достигал большей клеточной плотности, однако, продуктивность на последние сутки оказалась ниже, чем у клона В27.

Также сравнимой продуктивностью обладал В5, однако цикл его культивирования продолжался на трое суток меньше.

На дальнейшем этапе исследований важным было провести оценку стабильности отобранных клонов-продуцентов, поскольку данная характеристика является значимой для промышленного использования клеточных линий. Стабильная клеточная линия должна иметь постоянный уровень экспрессии целевого белка при культивировании в течение длительного срока, при этом в геноме клеток не должны происходить перестройки (транслокации, рекомбинации, делеции и др.) [30]. Было решено провести оценку продуктивности пяти отобранных клонов при пересевах в

Оценка ростовых и продуктивных свойств клонов, полученных методом предельных разведений, при культивировании в колбах объемом 125 мл

Growth and productivity evaluation of clones obtained by limited dilution method under 125 mL shake-flask cultivation

Номер клона	Batch-культивирование		Fed-batch-культивирование	
	T_{cp} сут, ч	Продуктивность, мг/л	T_{cp} сут, ч	Продуктивность, мг/л
B2*	22,3±0,2	5,9±0,4	22,6±0,6	122,3±17,1
B3	26,9±0,4	1,6±0,4	-	-
B5	24,2±0,6	7,0±1,2	25,0±0,8	197,3±22,3
B7	25,5±0,7	5,6±1,3	24,1±0,5	105,2±16,6
B8	23,7±0,4	10,4±1,9	23,0±0,7	260,4±25,6
B10	21,9±0,8	6,2±0,6	22,8±0,4	137,4±18,0
B11	24,5±0,3	3,2±0,2	-	-
B13	27,2±0,3	1,7±0,6	-	-
B14	22,8±0,6	3,9±0,7	-	-
B19	20,9±0,2	4,1±0,3	-	-
B20	26,7±0,5	2,0±0,4	-	-
B22	26,6±0,4	1,3±0,2	-	-
B27	25,2±0,3	12,8±2,1	24,1±0,4	332,5±28,2
B28	23,8±0,4	7,3±0,8	25,5±0,7	99,0±12,6
B32	27,0±1,1	1,1±0,3	-	-

Примечание: T_{cp} – среднее время удвоения клеток за 4 сут. Серой заливкой обозначены лидирующие варианты клонов, отобранные на этапе batch-культивирования, которые затем использовались в эксперименте fed-batch-культивирования

Note: Leading clones selected at batch-culture stage and then used for fed-batch cultivation, are marked in grey

течение 10 пассажей (около месяца непрерывного культивирования). Клоны B5, B8 и B27, а также B2 и B10 были выбраны по совокупности характеристик (времени удвоения за 4 сут и продуктивности на последние сутки культивирования в

эксперименте fed-batch), кроме того, их жизнеспособность была не менее 95% к началу эксперимента по оценке стабильности.

На 3-м и 13-м пассажах все субклоны засеивали в плотности $0,3 \cdot 10^6$ кл./мл в среду BalanCD

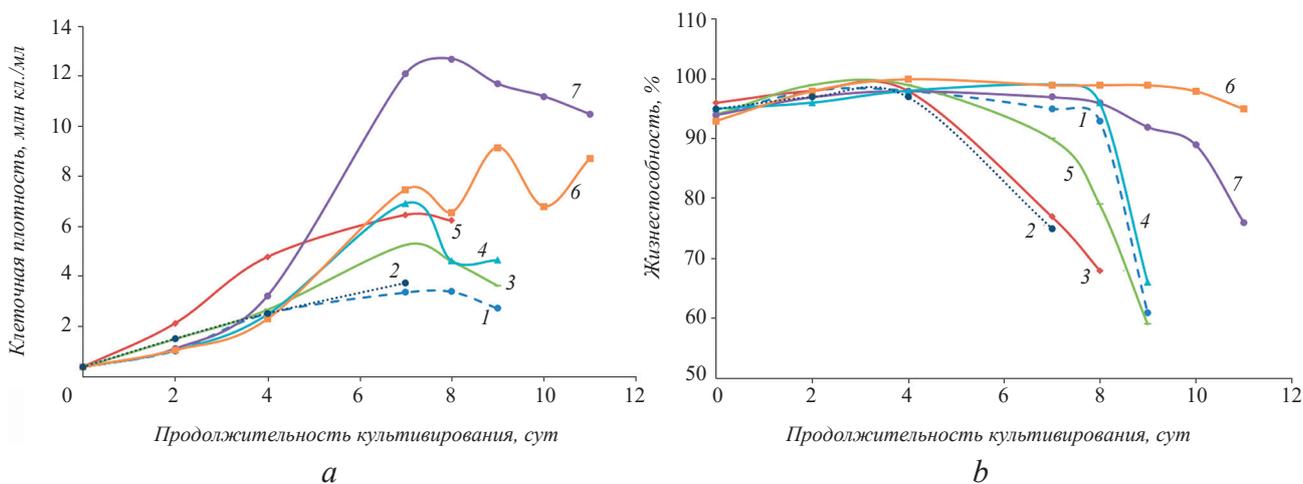


Рис. 4. Сравнение скорости роста (a) и жизнеспособности (b) субклонов линии A26a по результатам fed-batch-культивирования в колбах. 1 – клон B2; 2 – B28; 3 – B7; 4 – B10; 5 – B5; 6 – B27; 7 – B8

Fig. 4. Comparison of growth rate (a) and viability (b) of A26a subclones under fed-batch shake-flask cultivation. 1 – clone B2, 2 – clone B28, 3 – clone B7, 4 – clone B10, 5 – clone B5, 6 – clone B27, 7 – clone B8

Growth A, на 4-й день культивирования измеряли клеточную плотность и концентрацию антитела с помощью ИФА. По этим данным рассчитывали среднюю удельную продуктивность в пг/кл./день (рис. 5). Потеря специфической продуктивности за 10 пассажей для 4 клонов составила 20–30% от начального уровня. Только для субклона B27 зафиксировано наименьшее снижение продуктивности за вышеозначенный срок культивирования (~15%), что свидетельствует в пользу стабильности отобранных клеток.

Таким образом, по сумме признаков – скорости роста, удельной и объемной продуктивности, а также стабильности экспрессии антитела в течение месяца непрерывного культивирования, был отобран клон B27. Дальнейшая задача заключалась в подборе оптимальных условий его культивирования для повышения продуктивности.

Оптимизация условий культивирования отобранного субклона

К моменту начала работ по оптимизации сред для клона B27 был накоплен большой объем информации о средах и подпитках, которые до этого не были использованы в работе с клеточной линией A26. Используемые в работе среды и подпитки приведены в разделе «Условия эксперимента».

Предварительно была проведена адаптация клеток клона B27 к новым средам в течение 4 пассажей. Суммарно в скрининге участвовало 20 вариантов схем подпитки на 4 средах (табл. 2). Контрольной схемой культивирования являлась среда BalanCD Growth A с подпиткой BalanCD Feed 2, которая была ранее использована во всех экспериментах. В ходе процесса при необходимости

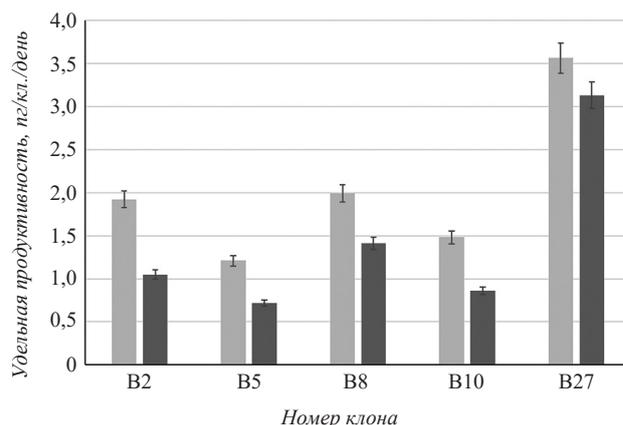


Рис. 5. Оценка стабильности продуктивных свойств клонов, полученных методом предельных разведений из адаптированной клеточной линии A26a. Светлые столбики – начальный уровень продуктивности; темные – продуктивность через 10 пассажей

Fig. 5. Productivity evaluation of subclones, obtained by limited dilution method from adapted cell line A26a. Light graphs – starting productivity level; dark graphs – productivity at 10 passage

сти в колбы добавляли глюкозу до концентрации 4–6 г/л. Эксперимент завершали при снижении жизнеспособности ниже 70%, концентрацию антитела в пробах измеряли с помощью ИФА.

Было показано, что культуральные характеристики и продуктивность могут быть существенно улучшены с помощью подбора состава и схемы введения подпиток. Как видно из представленных в табл. 2 данных, продолжительность процесса культивирования во всех случаях составила не менее 11 сут, значение клеточной плотности достигло более 20 млн кл./мл для всех вариантов.

Таблица 2

Схема культивирования клона B27 с подпитками в колбах

Scheme of fed-batch cultivation of B27 clone in shake-flasks

Среда	Подпитки	Схема внесения подпиток	КП _{макс} , млн кл./мл	T, сут	P, мг/л
BalanCD Growth A	BF2	5% BF2 – 3, 5, 7-й день; 10% BF2 – 9, 11, 13-й день	20,1±1,7	13	448±33
	FMS3	0,5X FMS3 – 3, 5, 7, 9, 11-й день	22,4±2,2	12	513±68
	U-Feeds	U-Feeds (1:4) – 3–11 дни	20,7±1,9	11	309±45
	CB2/CB5	5% CB2 – 3, 5, 7, 9, 11-й день; 5% CB5 – 4, 6, 8, 10-й день	25,0±3,1	12	525±73
SFM4CHO	BF2 + FMS3	5% BF2 – 3, 5, 7, 9, 11-й день; 0,5X FMS 3 – 4, 6, 8, 10-й день	21,2±2,4	15	607±86
	U-Feeds	U-Feeds (1:4) – 3–11 дни	25,6±2,6	14	504±39
	CB1/CB6	5% CB1 – 3, 5, 7, 9, 11-й день; 5% CB6 – 4, 6, 8, 10-й день	27,9±1,1	14	487±61

Среда	Подпитки	Схема внесения подпиток	КП _{макс} , млн/мл	T, сут	P, мг/л
SFM4CHO	CB2/CB5	5% CB2 – 3, 5, 7, 9, 11-й день; 5% CB5 – 4, 6, 8, 10-й день	22,8±0,9	15	429±55
Acti CHO P	ACFA + ACFB	1,5 + 0,15% (ACFA+ ACFB) – 3–7 дни, далее повышение до 2+0,2% и 3+0,3%	26,4±3,2	17	967±74
	CB2/CB5	5% CB2 – 3, 5, 7, 9, 11-й день; 5% CB5 – 4, 6, 8, 10-й день	22,7±1,5	13	530±44
	U-Feeds	U-Feeds (1:4) – 3–11 дни	28,1±2,9	15	633±39
	EFC	5% EFC – 3, 5, 7, 9, 11-й день	23,3±3,0	13	402±57
CellVento 210	Feed-210 + Cys/ Tyr	2% Feed-210 – 3–5 дни 4% Feed-210 – 6–11 дни 0,1% Cys/Tyr – 3–12 дни	35,6±3,3	19	1180±121
	FMS3	0,5X FMS 3 – 3, 5, 7, 9, 11-й день	27,7±1,7	14	721±62
	CB1/CB6	5% CB1 – 3, 5, 7, 9, 11-й день; 5% CB6 – 4, 6, 8, 10-й день	24,2±1,9	13	664±90
	U-Feeds	U-Feeds (1:4) – 3–11 дни	29,8±3,1	15	707±69
Ex-Cell CHO	Ex-Cell Feed 1	2% Ex-Cell Feed – 3–6 дни, 4% Ex-Cell Feed – 7–11 дни	32,8±2,5	18	854±98
	ACFA + ACFB	1,5 + 0,15% ACFA+B – 3–7 дни, далее повышение до 2+0,2% и 3+0,3%	30,5±2,8	17	802±101
	FMS3	0,5X FMS 3 – 3, 5, 7, 9, 11-й день	27,0±2,2	15	637±65
	U-Feeds	U-Feeds (1:4) – 3–11-й дни	24,7±1,8	15	720±42

Примечание: КП_{макс} – максимальная клеточная плотность; T – продолжительность процесса; P – продуктивность в КЖ на последние сутки. Серой заливкой обозначены наилучшие варианты комбинации среды и подпитки: CellVento 210 + комплексная подпитка Feed-210 + Cys/Tyr; Acti CHO P + комплексная подпитка Acti Feed A / Acti Feed B; Ex-Cell CHO + подпитка Ex-Cell Feed 1

Note: КП_{макс} – maximum cell density; T – duration of the process; P – productivity in QL for the last day. Gray fill indicates the best options for the combination of nutrient medium and recharge: CellVento 210 + complex recharge CellVento Feed-210 + Cys/ Tyr; Acti CHO P + complex recharge Acti Feed A / Acti Feed B; Ex-Cell CHO + recharge Ex-Cell Feed 1

Значение продуктивности на последние сутки культивирования в лучшем варианте оказалось в 2,6 раза выше, чем в контроле (1180 мг/л против 448 мг/л, соответственно).

Таким образом, любая из подобранных схем культивирования в колбах могла быть использована для масштабирования процесса в биореакторе.

На заключительном этапе исследований для субклона В27 было проведено несколько процессов культивирования в биореакторе (рабочий объем 5 л) с механическим перемешивающим элементом (Applikon). Была использована среда Acti CHO P с комплексной подпиткой ACFA+ACFB, схема ее внесения соответствовала описанной в табл. 2, данный вариант был использован как наиболее экономически оправданный с точки зрения организации производственного процесса. В биореакторе устанавливали постоянную скорость вращения мешалки 120 об/мин и скорость

подачи газов 1,2 л/мин, другие параметры проведения процессов – температура, рН, концентрация растворенного кислорода – и их регуляция были идентичны ранее проводимым процессам культивирования.

На рис. 6 показаны усредненные культуральные характеристики, уровень глюкозы и лактата в среде при культивировании клона В27 в биореакторе. Цикл культивирования, как и в колбах, продолжался 17 сут. Максимальная клеточная плотность в биореакторе примерно соответствовала таковой в колбах на аналогичной схеме подпитки (24,9 против 26,4 млн кл./мл) (рис. 6a). Выработка лактата клетками происходила плавно и достигла максимального значения 1,82 г/л на 8-е сутки, после чего было детектировано снижение лактата уровня в среде (рис. 6b), что свидетельствовало о переключении метаболизма клеток с выработки лактата на его потребление. Продуктивность по

АДАПТАЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ

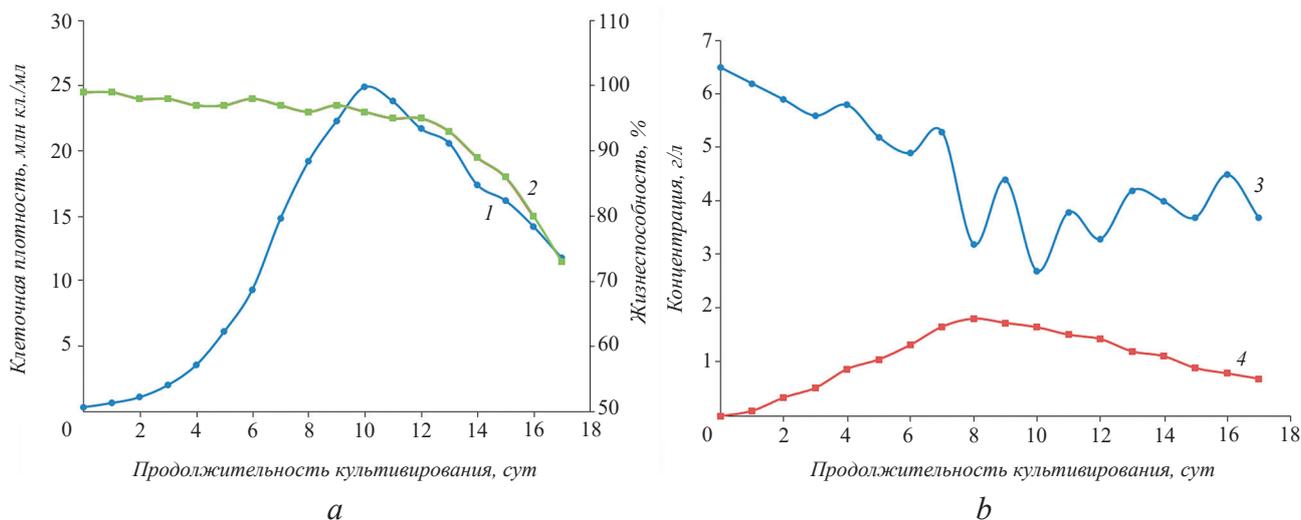


Рис. 6. Усредненные культуральные характеристики (а), уровень глюкозы и лактата в среде (b) при культивировании клона В27 в биореакторе STR-типа в среде Acti CHO P. 1 – клеточная плотность, 2 – жизнеспособность, 3 – уровень глюкозы; 4 – уровень лактата в КЖ

Fig. 6. Growth curve and viability (a), glucose and lactate production levels (b) of subclone B27 under STR bioreactor cultivation in Acti CHO P medium. 1 – cell density, 2 – viability, 3 – glucose level, 4 – lactate level

данным ИФА на 17-е сутки составила 980 мг/л, что сопоставимо с данными, полученными в колбах. Выход целевого продукта в результате культивирования клона в биореакторе показан для промышленного производства.

На рис. 7 приведена электрофореграмма с образцами КЖ, отобранными на последние сутки культивирования в биореакторе клона В27 (6) в сравнении с неадаптированным исходным клоном А26 (5) (образцы КЖ наносили в лунки геля в одинаковой нагрузке). Как видно, соотношение экспрессии тяжелой и легкой цепей антитела сохранилось, при этом детектировано увеличение концентрации антитела в образце КЖ клона В27.

Важнейший результат заключительного этапа исследований состоял в сохранении ключевых параметров, достигнутых в малом объеме: отобранный методом предельных разведений клон В27 сохранил свойства клеток адаптированных ранее к перемешиванию в биореакторе клеток А26а. Несмотря на тот факт, что от момента завершения адаптации клеточной линии А26 до получения окончательного субклона В27 прошло не менее 30 клеточных делений, в течение которых клетки культивировали в разных условиях (в многуночных планшетах, в культуральных флаконах, в колбах), у полученного клона не возникла чувствительность к механическому воздействию, как у родительских клеток А26.

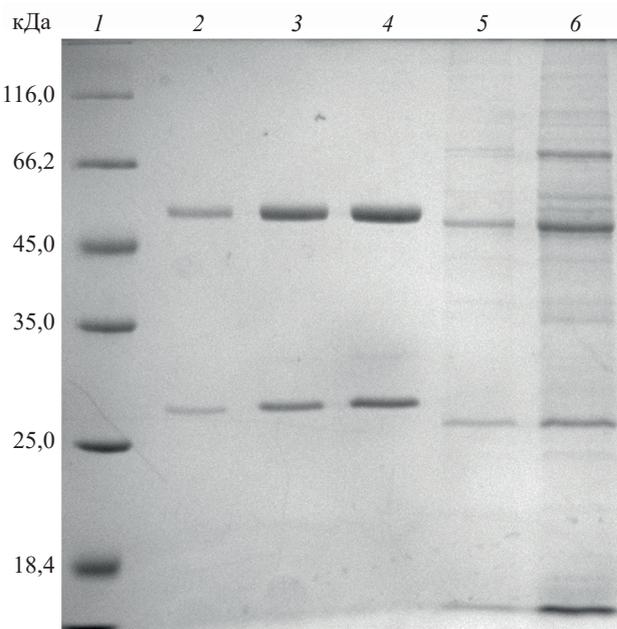


Рис. 7. Электрофореграмма (12,5% SDS-ПААГ) образцов КЖ, отобранных на последние сутки культивирования в STR-биореакторе. 1 – маркер молекулярных масс, 2, 3, 4 – стандартный образец IgG1 человека, 0,6, 1,2 и 1,5 мкг, соответственно; 5 – КЖ клона А26 (1 мкл), 6 – КЖ клона В27 (1 мкл)

Fig. 7. Electrophoregramm (12,5 % SDS-PAGE) of culture media samples taken from last day of STR bioreactor culture. 1 – molecular weight marker; 2, 3, 4 – standard human IgG1, 0,6, 1,2 and 1,5 μg, correspondingly; 5 – clone A26 (1 μL), 6 – clone B27 (1 μL)

Оценка содержания гликанов и щелочных форм антитела, выделенного из КЖ клонов A26 и B27 на последние сутки культивирования в STR-биореакторе

Glycane and basic isorforms content of antibody isolated from A26 and B27 clone STR culture media

Гликоформа	Относительное содержание гликоформ, %	
	A26	B27
G0F	68,5	62,9
G1Fa+G1Fb	21,6	24,8
G2F	2,1	3,5
G0	6,0	5,9
G1a+G1b	1,8	1,9
Man5	–	1,0
Щелочные формы, % от общего числа заряженных форм	79,4	75,1

Помимо исследования культуральных и продуктивных свойств адаптированной клеточной линии важным являлось сравнение качества производимого ею антитела, с таковым у неадаптированной клеточной линии. В качестве оцениваемых характеристик антитела были выбраны гликозилирование (состав гликоформ) и содержание заряженных форм. Гетерогенность антител по гликозилированию объясняется разной длиной и составом олигосахаридных цепочек, присоединяемых к остаткам аспарагина-297, при этом углеводная часть в значительной мере определяет стабильность, эффекторные функции молекулы и ее фармакокинетику [31, 32]. Помимо оценки гликанов было также проведено исследование содержания заряженных форм антитела, которые образуются в результате процессов окисления, дезамидирования, изомеризации, сиалирования, а также отщепления остатков С-концевого лизина тяжелой цепи антитела [33–35]. Результаты проведенного сравнительного анализа гликанов и заряженных форм антитела, нарабатываемых клонами A26 и B27 (до и после адаптации, соответственно), приведены в табл. 3.

Как видно из представленных в табл. 3 данных, основными детектированными гликоформами являются G0F и G1F(a,b), что является типичным для клеток СНО [32, 36]. Различие в их содержании для образцов КЖ, полученных из клеток до и после адаптации, составляет менее 15%. Не обнаружено значительных отличий и в содержании минорных форм гликанов. Оценка заряженных форм проведена по параметру содержания щелочных изоформ, которые представляют собой молекулы антител с 0, 1 или 2 остатками лизина на С-концевых участках тяжелых цепей. Как видно,

клетки после адаптации продуцируют антитела с меньшим содержанием щелочных форм, однако данный факт не является критическим для качества антитела и его фармакокинетики [37].

Таким образом, в ходе работы адаптация клеток исходного клона A26 с последующим отбором клонов методом предельных разведений позволила значительно улучшить характеристики и повысить эффективность процесса культивирования, при этом не произошло значительного изменения параметров качества антитела. Полученные данные подтверждают высокую изменчивость клеточных линий на основе СНО. Даже клеточные линии, прошедшие многоступенчатую селекцию, способны довольно легко менять свои фенотипические характеристики при изменении внешних условий.

Предложенный подход, вероятно, применим к сложным клеточным линиям, так как достаточно трудоемок и может несколько снижать продуктивность. Кроме того, результирующий пул клеток более гетерогенен генетически по сравнению с исходной культурой, из-за возможных разнонаправленных изменений генотипа, которые не всегда могут быть компенсированы селекцией с антибиотиком. Однако сильной стороной этого метода можно считать успешный исход при слабом росте клеток – достаточно поместить их в искомые условия, и та или иная адаптация произойдет. Высокую эффективность данного подхода во всех случаях, еще предстоит подтвердить в будущих исследованиях.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания №595-00004-18 ПР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gura T. Therapeutic antibodies: magic bullets hit the target. *Nature*, 2002, 417(6889), 584–586. doi 10.1038/417584a
2. Ho S.C., Tong Y.W., Yang Y. Generation of monoclonal antibody-producing mammalian cell lines. *Pharm. Bioprocess*, 2013, 1 (1), 71–87. doi: 10.4155/PBP.13.8
3. Kunert R., Reinhart D. Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, 100(8), 3451–3461. doi: 10.1007/s00253-016-7388-9
4. Anderson D.R., Grillo-López A., Varns C., et al. Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric 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
5. 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.
6. den 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
7. 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, 322(8930), 1105–1110. doi: 10.1016/S0140-6736(94)90628-9
8. 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. *J. Infect. Dis.*, 1998, 178(6), 1555–1561. doi: 10.1086/314523
9. Dumont J., Euwart D., Mei B., et al. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2016, 36(6), 1110–1122. doi: 10.3109/07388551.2015.1084266
10. Wurm F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnol.*, 2004, 22(11), 1393–1398. doi: 10.1038/nbt1026
11. Chu L., Robinson D.K. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2001, 12(2), 180–187. doi: 10.1016/S0958-1669(00)00197-X
12. 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
13. Dickson A.J. Enhancement of production of protein biopharmaceuticals by mammalian cell cultures: The metabolomics perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2014, 30, 73–79. doi: 10.1016/j.copbio.2014.06.004
14. Birch J., Arathoon R. Suspension culture of mammalian cells. *Bioprocess Technol.*, 1990, 10, 251–270.
15. De Jesus M., Wurm F.M. Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2011, 78(2), 184–188. doi: 10.1016/j.ejpb.2011.01.005
16. Al-Rubeai M., Singh R.P., Goldman M.H., Emery A.N. Death mechanisms of animal cells in conditions of intensive agitation. *Biotechnol Bioeng.*, 1995, 45(6), 463–472. doi: 10.1002/bit.260450602
17. Michaels J.D., Nowak J.E., Mallik A.K., et al. Analysis of cell-to-bubble attachment in sparged bioreactors in the presence of cell-protecting additives. *Biotechnol Bioeng.*, 1995, 47(4), 407–419. doi: 10.1002/bit.260470402
18. Senger R.S., Karim M.N. Effect of shear stress on intrinsic CHO culture state and glycosylation of recombinant tissue-type plasminogen activator protein. *Biotechnol. Prog.*, 2003, 19(4), 1199–1209. doi: 10.1021/bp025715f
19. Murhammer, D.W., Goochee C.F. Sparged animal cell bioreactors: mechanism of cell damage and Pluronic F-68 protection. *Biotechnol. Prog.*, 1990, 6(5), 391–397. doi: 10.1021/bp00005a012
20. Balandras F., Olmos E., Hecklau C., et al. Growth and death kinetics of CHO cells cultivated in continuous bioreactor at various agitation rates. *BMC Proc.*, 2011, 5(8), 101. doi: 10.1186/1753-6561-5-S8-P101
21. Wu J. Mechanisms of animal cell damage associated with gas bubbles and cell protection by medium additives. *J. Biotechnol.*, 1995, 43(2), 81–94. doi: 10.1016/0168-1656(95)00133-7
22. Wu, J., Ruan Q., Lam H.Y.P. Effects of surface-active medium additives on insect cell surface hydrophobicity relating to cell protection against bubble damage. *Enzyme Microb. Technol.*, 1997, 21(5), 341–348.
23. Chalmers J.J. Mixing, aeration and cell damage, 30+ years later: what we learned, how it affected the cell culture industry and what we would like to know more about. *Curr. Opin. Chem. Eng.*, 2015, 10, 94–102. doi: 10.1016/j.coche.2015.09.005
24. Zhang X., Stettler M., De Sanctis D. Use of orbital shaken disposable bioreactors for mammalian cell cultures from the milliliter-scale to the 1,000-liter scale. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2009, 115, 33–53. doi: 10.1007/10_2008_18
25. Voronina E.V., Seregin Y.A., Litvinova N.A., et al. Design of a stable cell line producing a recombinant monoclonal anti-TNF α antibody based on a CHO cell line. *Springerplus*, 2016, 5(1), 1584. doi: 10.1186/s40064-016-3213-2
26. Chusainow J., Yang Y.S., Yeo J.H.M. A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: what makes a stable high producer? *J. Biotechnol. Bioeng.*, 2009, 201(4), 1182–1196. doi: 10.1002/bit.22158

27. Лобанова Н.В., Нурбаков А.А., Аксенова В.И. и др. Оптимизация профиля гликозилирования рекомбинантного интерферона-бета-1а при культивировании клеток CHO в биореакторе волнового типа. *Биотехнология*, 2013, 2, 55–66.
28. Durocher Y., Butler M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2009, 20, 700–707. doi: 10.1016/j.copbio.2009.10.008
29. Wurm F.M. CHO Quasispecies—Implications for Manufacturing Processes. *Processes*, 2013, 1(3), 296–311. doi: 10.3390/pr1030296
30. Kim M., O'Callaghan P.M., Droms K.A., James D.C. Mechanistic understanding of production instability in CHO cell lines expressing recombinant monoclonal antibodies. *Biotechnol. Bioeng.*, 2011, 108, 2434–2446. doi: 10.1002/bit.23189
31. Boswell C.A., Tesar D.B., Mukhyala K. et al., Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics. *Bioconjugate Chem.*, 2010, 21(12), 2153–2163. doi: 10.1021/bc100261d
32. Brady L., Velayudhan J., Visone D., et al. The criticality of high-resolution N-linked carbohydrate assays and detailed characterization of antibody effector function in the context of biosimilar development. *Monoclonal Antibodies*, 2015, 7(3): 562–570. doi: 10.1080/19420862.2015.1016692
33. Antes B., Amon S., Rizzi A., et al. Analysis of lysine clipping of a humanized Lewis-Y specific IgG antibody and its relation to Fc-mediated effector function. *J. Chromatogr.*, 2007, 852(1–2), 250–256. doi: 10.1016/j.jchromb.2007.01.024
34. Chirino A.J., Mire-Sluis A. Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes. *Nat. Biotechnol.*, 2004, 22(11), 1383–1391. doi: 10.1038/nbt1030
35. Vlasak J., Ionescu R. Heterogeneity of monoclonal antibodies revealed by charge-sensitive methods. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2008, 9(6), 468–481. doi: 10.2174/138920108786786402
36. Bandyopadhyay S., Mahajan M., Mehta T., et al. Physicochemical and functional characterization of a biosimilar adalimumab ZRC-319. *Biosimilars*, 2015, 5, 1–18. doi: 10.2147/BS.S75573
37. Singh, S.K., Narula G., Rathore A.S. Should charge variants of monoclonal antibody therapeutics be considered critical quality attributes? *Electrophoresis*, 2016, 37(17–18): 2338–2346. doi: 10.1002/elps.201600078.

Adaptation of Monoclonal Antibody Producing Cell Line to Stirred-Tank Bioreactor Conditions

N.V. LOBANOVA^{1,*}, E.V. VORONINA², A.A. NURBAKOV², A.A. KLISHIN¹, and Yu.A. SEREGIN¹

¹State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the National Research Center Kurchatov Institute (NRC «Kurchatov Institute» – GOSNIIGENETIKA), 117545, Moscow Russia

²Limited Liability Company «PHARMAPARK», 117246, Moscow, Russia

*e-mail: nataliya.lobanova383@gmail.com

Received October 01.2018

Revised November 01.2018

Accepted Desember 15, 2018

Abstract—Using gradual two-step adaptation to the bioreactor (STR) conditions, a cell subpopulation of IgG1-producing CHO cell line that was insensitive to mechanical impact was selected. The limiting dilution method was used for the selection from the adapted cells of a clone, for which the target protein stable production was confirmed, and optimization and scaling-up of culturing were carried out. The cultivation of the selected clone in STR was characterized by maintaining the key growth parameters. The increase in the maximal cell density by 3.5 times, process duration by 4 days and productivity by about 9 times as compared to unadapted cells were observed.

Key words: CHO cells, monoclonal antibody, culturing, bioreactor, adaptation, lactate, stress.

Acknowledgment – The investigation was supported by Ministry of Education and Science of the Russian Federation in the frame of state contract №595-00004-18 PR.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-6-80-94