

УДК 602.6:612

А.Н. МОРОЗОВ\*, З.В. ЗАХАРОВ, Р.А. КОЧЕЛАБОВ, Д.В. ТЮПА, А.В. ИСЕРКАПОВ, Р.И. ФАРСИЕВА, М.А. СМОЛОВ

ООО «Международный биотехнологический центр «Генериум»», Владимирская область, Петушинский район, пос. Вольгинский, 601125

e-mail: morozov@ibcgenerium.ru

## Оптимизация ускорения перфузии — ключевой этап разработки высокопроизводительного перфузионного культивирования клеток CHO

Изучено влияние режима потока питательной среды в начальной фазе перфузионного процесса на характеристики роста клеток линии CHO, продуцирующих IgG1 терапевтического назначения, а также на профиль гликозилирования синтезируемого белка. Было установлено, что при неоптимальных значениях ускорения перфузии возникают отклонения от нормального перехода культуры клеток в стационарную фазу процесса. Например, в результате слишком быстрого увеличения скорости перфузии наблюдается превышение максимальной концентрации клеток, которую способна поддерживать питательная среда. Происходит лимитирование роста культуры, результатом которого становится прекращение пролиферации и падение жизнеспособности. Дальнейшее восстановление культуры занимает несколько суток, что снижает экономическую эффективность процесса культивирования. В свою очередь, при недостаточном ускорении перфузии возникают метаболические перестройки клеток-продуцентов, в результате которых отмечается изменение удельной продуктивности и качества целевого белка. В частности, уменьшается степень фукозилирования целевой молекулы, что может негативно сказаться на профиле безопасности лекарственного препарата. Также можно наблюдать существенное замедление пролиферации клеток с одновременным увеличением их объема в 2—2,5 раза.

*Ключевые слова:* биореактор, гликозилирование, клетки CHO, оптимизация, перфузия, ускорение перфузии.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-4-60-67

### Список терминов

Фед-батч (fed batch)— культивирование микроорганизмов или культур клеток в периодическом режиме с подпиткой.

Перфузия — разновидность непрерывного культивирования с частичным или полным отделением клеток от выходящего потока культуральной жидкости и возвращением их в биореактор.

Ускорение перфузии — изменение скорости разбавления (перфузии) за единицу времени, сут<sup>-2</sup>.

Удельная скорость перфузии (УСП) — отношение скорости потока питательной среды (условный термин, означающий совокупность скорости притока питательной среды и оттока бесклеточной КЖ) к концентрации клеток, пл/кл/сут.

Стационарная фаза перфузионного культивирования — фаза перфузионного процесса, в которой рост клеток в биореакторе компенсирован их отбором, так что концентрация клеток в течение длительного времени поддерживается на определенном уровне с незначительными отклонениями.

Блидинг (bleeding) — непрерывный или дискретный отбор суспензии клеток из биореактора в стационарной фазе перфузионного культивирования для предотвращения перерастания культуры и возникновения лимитирования питательными субстратами.

Морозов Антон Николаевич, Захаров Захар Викторович, Кочелабов Роман Александрович, Тюпа Дмитрий Валериевич, Исеркапов Артем Вакилевич, Фарсиева Регина Ильгизовна, Смолов Максим Александрович.

*Список сокращений:* ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; КЖ — культуральная жидкость; УСП — удельная скорость перфузии; ADCC (antibody-dependant cell cytotoxicity) — антителозависимая клеточная цитотоксичность; IgG1 — иммуноглобулин, фракция 1.

\* Автор для переписки.

Биофармацевтическая отрасль широко использует клетки млекопитающих для получения рекомбинантных белков терапевтического назначения. Наиболее востребованной клеточной линией в производстве гликозилированных белков является линия *CHO*, полученная из клеток яичника китайского хомячка. На сегодняшний день основными способами культивирования животных клеток являются фэд-батч и перфузия [1]. Выбор между двумя процессами зависит от многих факторов, включающих совокупную потребность в лекарственном препарате, стабильность используемой клеточной линии, склонность целевого белка к деградации и т.д. Решение об использовании того или иного способа культивирования принимается разработчиком в каждом конкретном случае на основании тщательной оценки этих факторов.

В последнее время перфузионные процессы культивирования становятся все более востребованными со стороны производителей биофармацевтических препаратов. Это обусловлено рядом преимуществ, которыми обладает перфузия перед традиционным периодическим культивированием. Основное преимущество — существенно большая производительность перфузионных процессов, в 4—10 раз превышающая производительность периодических процессов [2]. Эта разница обусловлена высокой концентрацией клеток, которая достигается в перфузионных реакторах за счет частичного или полного отделения биомассы продуцента от выходящего потока КЖ и возвращения ее в биореактор. Кроме того, для перфузионных процессов характерны благоприятные и стабильные условия роста клеток благодаря непрерывному отводу продуктов метаболизма и внесению свежих питательных веществ. Короткое время пребывания продукта в биореакторе и низкое содержание протеаз в КЖ обеспечивают высокое качество целевого белка. Это особенно важно для высоколабильных, склонных к деградации гликопротеинов, таких, как факторы свертываемости крови и некоторые лизосомные ферменты [3].

Разработка перфузионного культивирования представляет собой комплексную задачу, состоящую из нескольких основных этапов: подбор состава питательной среды, оптимизация режимных параметров процесса (рН, концентрация растворенного кислорода, температура культивирования и др.), а также оптимизация протока питательной среды и скорости отбора суспензии клеток. Конечной целью разработки является воспроизводимый и устойчивый процесс культивирования, характеризующийся высокой концентрацией жизнеспособных клеток, стабильно продуцирующих

целевой белок требуемого качества. Отличительная черта эффективного перфузионного процесса — длительная стационарная фаза, в течение которой концентрация клеток поддерживается на постоянном уровне за счет непрерывного отбора клеточной суспензии из биореактора (блидинга). Продолжительность стационарной фазы может составлять несколько недель или даже месяцев.

Наши наблюдения показывают, что особое внимание в ходе разработки перфузионного культивирования клеток *CHO* должно быть уделено начальному этапу процесса — стадии накопления биомассы. Именно она определяет физиологическое состояние культуры клеток при переходе в стационарную фазу. Действительно, согласно полученным в настоящей работе данным (см. ниже), оптимальные параметры протока питательной среды в логарифмической фазе культивирования предотвращают лимитирование культуры компонентами питания и обеспечивают плавность перехода клеток в стационарную фазу. Неверно выбранная стратегия во время активного роста клеток может привести к снижению экономической эффективности процесса и нестабильности качества целевого белка.

Несмотря на значительное количество исследований, посвященных разработке перфузионных процессов культивирования клеток *CHO*, практически отсутствуют работы, описывающие влияние режима протока питательной среды на начальном этапе перфузии на поведение клеток в стационарной фазе.

Большинство исследователей сходится во мнении, что ключевым фактором в ходе непрерывного перфузионного культивирования является удельная скорость перфузии (УСП), представляющая собой отношение скорости перфузии к концентрации клеток в биореакторе [4—7]. Отмечается, что УСП в стационарной фазе процесса необходимо поддерживать на таком уровне, чтобы избежать лимитирования питательными компонентами, предотвратить накопление токсических побочных продуктов и обеспечить постоянное клеточное окружение. Изменение скорости отбора клеток (скорости блидинга) позволяет регулировать УСП. При должной степени изученности процесса с помощью блидинга можно эффективно управлять качеством целевого белка и влиять на удельную продуктивность клеток [8]. Однако все это справедливо для стационарной фазы процесса, когда уже достигнута и поддерживается максимальная рабочая концентрация клеток. Для начальной фазы культивирования, когда метаболизм клеток претерпевает непрерывные изменения, влия-

ние удельной скорости перфузии на поведение клеток изучено мало.

Одной из причин отсутствия исследований, посвященных начальному этапу перфузионного процесса, может быть тот факт, что большая часть более ранних работ проводилась на питательных средах предыдущего поколения, неспособных поддерживать высокую удельную скорость роста клеток в течение длительного времени. В то же время, хорошо известно, что динамика роста культуры клеток существенно зависит от используемой питательной среды [9]. Современные питательные среды, оптимизированные для периодических процессов, могут производить избыточный стимулирующий эффект, который негативно сказывается на способности клеток стабильно расти при определенной клеточной плотности в стационарной фазе перфузионного процесса (данные не приведены).

Целью данного исследования было изучение влияния различных режимов ускорения перфузии при культивировании клеток *CHO*, продуцирующих моноклональные антитела терапевтического назначения, на динамику роста клеток, способность эффективно переходить в стационарную фазу процесса и синтезировать качественный целевой белок.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве модели для изучения использовали исследовательскую клеточную линию *CHO-M*, продуцирующую терапевтические антитела нейтрализующего действия. Клетки выращивали в шейкере-инкубаторе Climo-Shaker ISF1-XC (Kuhner, Швейцария) при 90 об/мин в колбах Эрленмейера на коммерческой питательной среде BalanCD CHO Growth A (Irvine Scientific, США), содержащей 6 мМ L-глутамин (Applichem, Германия) при 37° и 5%-ном содержании CO<sub>2</sub>. Полученный инокулят вносили в биореактор, содержащий питательную среду того же состава. Состав питательной среды для перфузии был следующий: 90% BalanCD CHO Growth A, 10% BalanCD CHO Feed 3 (Irvine Scientific) и 6 мМ L-глутамин.

Перфузионное культивирование клеток осуществляли в одноразовых биореакторах волнового типа Sartorius Flexsafe 10L perfusion (Sartorius, Германия) со встроенной перфузионной мембраной и рабочим объемом суспензии 3,0 л. Посевная концентрация составляла  $(0,5 \pm 0,1) \cdot 10^6$  кл/мл.

Концентрацию растворенного кислорода в биореакторах поддерживали на уровне 50% от насыщения. Расход газовой смеси составлял 0,3 л/мин.

Также осуществляли рН-стагирование на уровне 6,9 в течение всего процесса культивирования с помощью подачи CO<sub>2</sub> или 5%-ного раствора гидроксида натрия (Panreac Applichem, Германия). Частота качания платформы с биореактором находилась в диапазоне 22—28 /мин; угол наклона платформы составлял 6°; температура культивирования в фазе роста — 37°. При достижении скорости перфузии 0,5 сут<sup>-1</sup> температуру снижали до 34°.

С помощью перистальтических насосов, расположенных на блоке управления биореактором, осуществляли непрерывную подачу свежей питательной среды и отбор бесклеточного перфузата и суспензии клеток. Контроль перфузии велся с помощью двух весовых платформ Midrics (Sartorius).

Проток питательной среды и отбор перфузата включали через 48 ч после инокуляции среды в биореакторе. Скорость перфузии увеличивали линейно от 0 до 1,0 сут<sup>-1</sup> с различным ускорением — 0,1 сут<sup>-2</sup>, 0,15 сут<sup>-2</sup> и 0,25 сут<sup>-2</sup>. В каждом процессе культивирования за сутки до достижения максимальной скорости перфузии начинали отбор клеточной суспензии (блидинг) на уровне 0,1 сут<sup>-1</sup>. Культивирование прекращали через 22 дня.

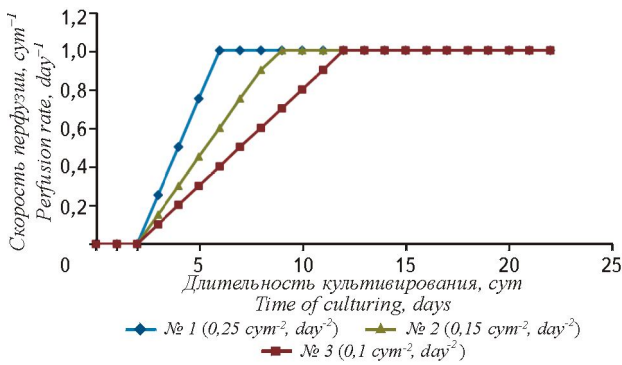
Определение концентрации и жизнеспособности клеток, а также их среднего диаметра проводили с помощью автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen, США). Концентрацию глюкозы и лактата в КЖ измеряли на анализаторе BioSen C-line (EKF-Diagnostic, Германия). Контрольное измерение рН проводили непосредственно после отбора пробы на рН-метре SevenEasy S20 (Mettler Toledo, Швейцария).

Концентрацию антител в культуральной жидкости определяли путем выделения целевого белка на аффинном сорбенте MabSelect (GE Healthcare, Швеция) и измерения его количества на спектрофотометре BioPhotometer Plus (Eppendorf, Германия) при длине волны 280 нм с использованием расчетного коэффициента экстинкции.

Анализ профиля гликозилирования целевого белка проводили с использованием системы ВЭЖХ Alliance e2695 (Waters, США) с детектором Multi λ Fluorescence Detector 2475 (Waters) на колонке TSKgel Amide-80 (Tosoh Corporation, Япония).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании максимальная скорость перфузии была ограничена значением 1,0 сут<sup>-1</sup>. Увеличение скорости протока питательной среды до верхнего предела вели с тремя разными ускорениями: 0,25 сут<sup>-2</sup> (процесс № 1), 0,15 сут<sup>-2</sup> (процесс № 2) и 0,1 сут<sup>-2</sup> (процесс № 3). Графически из-



**Рис. 1.** Динамика скорости протока среды при различных значениях ускорения перфузии

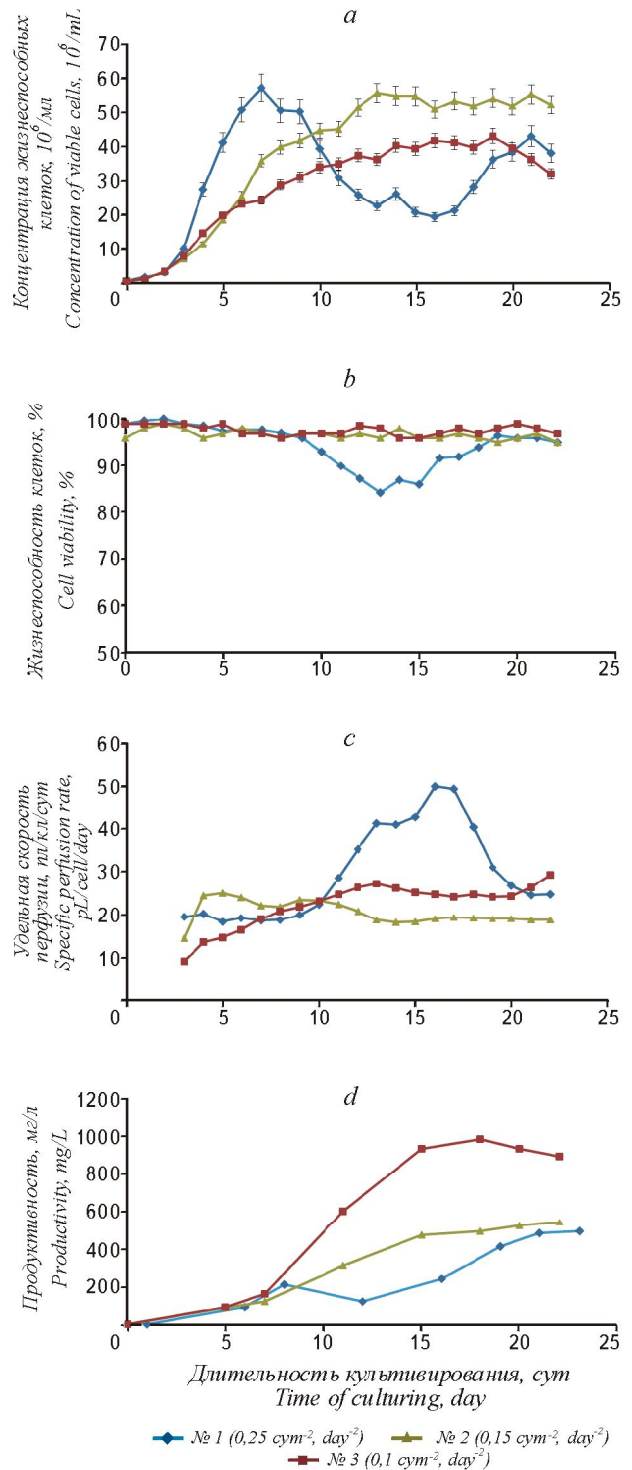
**Fig. 1.** Dynamics of medium flow at various perfusion accelerations

менения скорости перфузии в ходе экспериментальных процессов представлены на рис. 1.

В ходе процесса № 1 наблюдали наибольшую скорость роста клеток с достижением пика их концентрации на седьмые сутки (рис. 2, *a*). Затем была отмечена резкая остановка пролиферации, за которой последовало частичное вымывание клеток за счет непрерывного отбора суспензии. Одновременно снижалась жизнеспособность культуры (до 82%, см. рис. 2, *b*). Причиной такого поведения, как правило, является лимитирование по одному из компонентов питательной среды, вероятнее всего, незаменимой аминокислоте [10]. Необходимо подчеркнуть, что блидинг, начавшийся за сутки до достижения максимальной скорости протока среды, оказался неэффективным и не предотвратил лимитирование роста культуры. Таким образом, стимулирование метаболизма растущих клеток при избыточном ускорении перфузии привело к истощению ключевых компонентов питательной среды и негативным последствиям для пролиферации и выживаемости клеток.

Стоит отметить, что за счет вымывания клеток и быстрого снятия питательных ограничений отмирание культуры в процессе № 1 оказалось обратимым и через 9 сут нормальный рост и продуктивность клеток восстанавливались (см. рис. 2, *a, d*). Однако период восстановления, на наш взгляд, является довольно длительным и снижает общую эффективность процесса культивирования.

В ходе процессов № 2 и № 3 наблюдалась более низкая скорость роста клеток на начальных этапах (начиная с третьих суток) и отсутствие лимитирования компонентами питания. Жизнеспособность культуры оставалась высокой в течение всего выращивания. До шестых суток динамика роста клеток в двух процессах не различалась (см. рис. 2, *a*).



**Рис. 2.** Кривые роста (*a*) и жизнеспособности (*b*) клеток, изменения удельной скорости перфузии (*c*) и продуктивности культуры (*d*) при различных значениях ускорения перфузии

**Fig. 2.** Curves of cell growth (*a*) and viability (*b*), changing of specific perfusion rate (*c*) and culture productivity (*d*) at various perfusion accelerations

**Динамика среднего диаметра и теоретического объема клеток при различных значениях ускорения перфузии (в скобках)**  
**Dynamics of mean size and theoretical volume of cells at various perfusion accelerations (in brackets)**

Время культивирования, сут Time of culturing, day	Процесс № 1 (0,25 сут <sup>-2</sup> ) Process no.1 (0.25 day <sup>-2</sup> )		Процесс № 2 (0,15 сут <sup>-2</sup> ) Process no. 2 (0.15 day <sup>-2</sup> )		Процесс № 3 (0,10 сут <sup>-2</sup> ) Process no. 3 (0.1 day <sup>-2</sup> )	
	Средний диаметр клетки, мкм Cell mean diameter, μ	Теоретический объем клетки, пл Theoretical volume, pL	Средний диаметр клетки, мкм Cell mean diameter, μ	Теоретический объем клетки, пл Theoretical volume, pL	Средний диаметр клетки, мкм Cell mean diameter, μ	Теоретический объем клетки, пл Theoretical volume, pL
	0	10,9	0,68	10,2	0,56	10,5
2	10,5	0,61	9,7	0,48	10,3	0,57
4	10,3	0,57	10,0	0,52	11,1	0,72
6	10,7	0,64	10,1	0,54	11,2	0,74
8	10,1	0,54	10,3	0,57	11,8	0,86
10	10,1	0,54	10,6	0,62	12,4	1,00
12	10,5	0,61	11,1	0,72	13,0	1,15
14	11,0	0,70	11,1	0,72	13,4	1,26
16	11,1	0,72	11,3	0,76	13,5	1,29
18	11,3	0,76	11,0	0,70	13,9	1,41
20	11,3	0,76	11,4	0,78	14,0	1,44
22	11,4	0,78	11,9	0,88	14,1	1,47

Начиная с седьмых суток было отмечено замедление скорости пролиферации клеток (до 0,1 сут<sup>-1</sup>) в процессе с наименьшим ускорением перфузии. Одновременно с этим клетки начали увеличиваться в объеме. В течение следующих шести суток их объем в среднем увеличился в 2—2,5 раза (табл. 1). В то же время жизнеспособность сохранялась на высоком уровне (выше 96%), а удельная продуктивность (тотальная продуктивность, отнесенная к концентрации клеток) увеличивалась в 1,7—2 раза по отношению к контролю (нерастащие клетки). При этом удельная скорость перфузии к восьмым суткам выровнялась у всех трех процессов (см. рис. 2, с). Можно сделать вывод, что при одной и той же УСП клетки могут демонстрировать кратно различающуюся удельную

продуктивность, обусловленную некими метаболическими сдвигами, происходящими на этапе накопления биомассы. Можно также предположить, что метаболический сдвиг затрагивает не только количественную сторону продукции белка, но и качество целевой молекулы. Действительно, проведенное нами исследование профиля гликозилирования белка, который накапливают гипертрофированные клетки, показало уменьшение степени фукозилирования гликопротеина за счет увеличения доли гликанов G0 и Man5 (рис. 3).

Как известно, частичное или полное дефукозилирование IgG1 может увеличивать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) целевой молекулы и быть нежелательным для большинства терапевтических моноклональных анти-

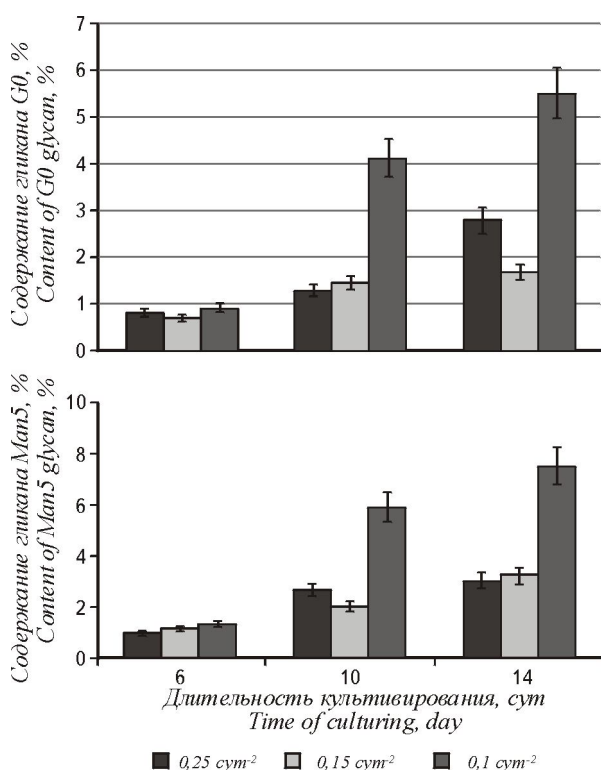


Рис. 3. Относительное содержание N-связанных гликанов G0 и Man5 в Fc-домене продуцируемого белка при различных значениях ускорения перфузии

Fig. 3. Relative content of N-bound glycans G0 and Man5 in Fc-domain of produced protein at various perfusion accelerations

тел [11—13]. Увеличение содержания высокоманнозного гликана Man5, кроме того, может изменять фармакокинетику гликопротеина, уменьшая период его полувыведения из плазмы крови человека. В процессе с наименьшим ускорением перфузии доля гликана G0, не содержащего фукозу, выросла по ходу культивирования более чем в 6 раз (с 0,9% до 5,5%), Man5 — более чем в 5 раз (с 1,3 до 7,5%) (см. рис. 3). Таким образом, в ходе процесса с наименьшим ускорением перфузии как минимум один критический параметр качества продуцируемого белка претерпевает изменение, которое может оказать негативное влияние на эффективность и безопасность получаемого препарата.

В процессе № 2 не наблюдалось отклонений от нормального течения культивирования. На 12-й день культура вступила в стационарную фазу, в течение которой скорость роста, жизнеспособность и продуктивность клеток (см. рис. 2), а также качество белка (см. рис. 3) не претерпевали серьезных изменений.

Если вернуться к удельной скорости перфузии, которая оказывает наибольший эффект на поведение культуры клеток в течение стационарной фазы культивирования, то можно отметить, что во всех трех процессах с седьмого по десятый день УСП находилась примерно на одном уровне (20±2 пл/кл/сутки). При этом характеристики роста клеток на данном отрезке кардинально различа-

Таблица 2

Table 2

Относительное содержание некоторых N-связанных гликанов (%) в Fc-домене продуцируемого белка в ходе культивирования при различных значениях ускорения перфузии (в скобках)  
Relative content of some N-bound glycans, %, in Fc-domain of produced protein during cultivation at various perfusion acceleration rates (in brackets)

Гликан Glycan	Процесс № 1 (0,25 сут <sup>-2</sup> ) Process no.1 (0.25 day <sup>-2</sup> )			Процесс № 2 (0,15 сут <sup>-2</sup> ) Process no.2 (0.15 day <sup>-2</sup> )			Процесс № 3 (0,10 сут <sup>-2</sup> ) Process no.3 (0.10 day <sup>-2</sup> )		
	6-е сутки 6 <sup>th</sup> day	10-е сутки 10 <sup>th</sup> day	14-е сутки 14 <sup>th</sup> day	6-е сутки 6 <sup>th</sup> day	10-е сутки 10 <sup>th</sup> day	14-е сутки 14 <sup>th</sup> day	6-е сутки 6 <sup>th</sup> day	10-е сутки 10 <sup>th</sup> day	14-е сутки 14 <sup>th</sup> day
	G0F	74,0	68,7	73,5	75,3	77,0	76,6	70,3	70,2
G1F	15,1	18,3	17,7	17,9	9,9	9,5	16,2	7,1	6,5
G2F	1,4	1,8	1,6	1,7	1,2	1,1	1,5	0,4	0,3
G0	0,8	1,3	2,8	0,7	1,4	1,7	0,9	4,1	5,5
Man5	1,0	2,6	3,0	1,1	2,0	3,2	1,3	5,9	7,5

лись (см. рис. 2), что свидетельствует о решающем влиянии на характер роста клеток первых дней перфузии. Более того, для процесса № 2 на протяжении 6 сут (с 4-го по 10-й день культивирования) характерна более высокая удельная скорость перфузии, чем для процесса № 1. Несмотря на это, скорость роста клеток в процессе № 1 была существенно выше. По всей вероятности, решающее влияние на скорость пролиферации культуры в данном случае оказали момент включения перфузии и начальная скорость протока среды. Из сказанного ясно, что при оптимизации начального этапа перфузионного процесса наиболее перспективным входным параметром является *ускорение перфузии*. Использование же в качестве входного параметра *удельной скорости перфузии* может приводить к нестабильным результатам и, кроме того, этот параметр является технически более сложным, поскольку требует специального устройства для определения концентрации клеток в режиме реального времени.

Таким образом, в результате проведенных исследований было выявлено, что режим протока питательной среды на начальном этапе перфузионного процесса может существенно влиять на основные параметры роста и продуктивности культуры клеток *CHO* и основополагающие свойства продуцируемого белка.

Недостаточно быстрое увеличение скорости перфузии приводит к метаболическим перестройкам клетки, снижающим ее пролиферативные характеристики и одновременно увеличивающим удельную продуктивность культуры. Качество целевого рекомбинантного белка (уровень фукозилации и содержание гликанов) при этом значительно изменяется, что может привести к снижению эффективности и безопасности лекарственного препарата. Стоит отметить, что жизнеспособность культуры остается стабильно высокой в течение всего процесса культивирования.

Слишком быстрое увеличение скорости перфузии поддерживает высокую удельную скорость роста культуры в течение всего этапа накопления биомассы, в связи с чем при достижении максимальной скорости протока клетки не успевают перестроить свой метаболизм и их концентрация превышает предельную для данной питательной среды, вследствие чего рост клеток оказывается лимитированным по одному или нескольким компонентам. Это, в свою очередь, приводит к резкому падению жизнеспособности клеток, разбалансировке процесса и длительному периоду восстановления культуры. Это восстановление может занимать несколько суток, что негативно отражается на технико-экономических характеристиках процесса.

Поскольку поведение клеток во время начального этапа перфузионного процесса является специфичным для каждого клона, а также сильно зависит от используемой питательной среды и физических параметров культивирования, оптимизация ускорения перфузии должна осуществляться для каждого разрабатываемого процесса индивидуально.

Получено 07.07.16

## ЛИТЕРАТУРА

1. Hu, W.S. Large-scale mammalian cell culture / W.S. Hu, J.G. Aunins // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 1997. — V. 8 — P. 148—153.
2. Ozturk, S.S., Optimization of High Cell Density Perfusion Bioreactors: Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies [Eds. S.S. Ozturk, W.S. Hu]. — New York: Taylor & Francis, 2006. — P. 387—416.
3. Clincke, M.-F. Very High Density of CHO Cells in Perfusion by ATF or TFF in WAVE Bioreactor. Part I. Effect of Cell Density on the Process / M.-F. Clincke, C. Molleryd, Y. Zhang, E. Lindskog, K. Walsh, V. Chotteau // *Biotechnol. Progr.* — 2013. — V. 29. — N. 3. — P. 754—767.
4. Konstantinov, K. The “Push-to-Low” approach for optimization of high-density perfusion cultures of animal cells / K. Konstantinov, C. Goudar, M. Ng, R. Meneses, J. Thrift, S. Chuppa, C. Matanguihan, J. Michaels, D. Naveh // *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* — 2006. — 101. — P. 75—98.
5. Dalm, M. Effect of Feed and Bleed Rate on Hybridoma Cells in an Acoustic Perfusion Bioreactor: Part I. Cell Density, Viability and Cell-Cycle Distribution / M. Dalm, S. Cuijten, W. van Grunsven, J. Tramper, D. Martens // *Biotechnol. Bioeng.* — 2004. — V. 88 — P. 547—557.
6. Ozturk, S.S. Engineering Challenges in High Density Cell Culture Systems // *Cytotechnol.* — 1996. — V. 22. — P. 3—16.
7. Meuwly, F. Optimization of the medium perfusion rate in a packed-bed bioreactor charged with CHO cells / F. Meuwly, U. von Stockar, A. Kadouri // *Cytotechnol.* — 2004. — V. 46(1) — P. 37—47.
8. Zeng, A.-P. Model simulation and analysis of perfusion culture of mammalian cells at high cell density / A.-P. Zeng, W.-D. Deckwer // *Biotechnol. Progr.* — 1999. — V. 15 — P. 373—382.
9. Fletcher T. Designing culture media for recombinant protein production: A rational approach / T. Fletcher // *BioProcess International* — 2005. — V. 3 — P. 30—36.
10. Duarte, T. Metabolic responses of CHO cells to limitation of key amino acids / T. Duarte, N. Carinhas, L. Barreiro, M. Carrondo, P. Alves, A. Teixeira // *Biotechnol. Bioeng.* — 2014. — V. 111(10) — P. 2095—2106.
11. Hamm, M. Characterization of N-Linked Glycosylation in a Monoclonal Antibody Produced in NS0 Cells Using Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection / M. Hamm, Y. Wang, R. Rustandi // *Pharmaceuticals (Basel)*. — 2013. — V. 6 — N. 3. — P. 393—406.

12. Hossler, P. Optimal and Consistent Protein Glycosylation in Mammalian Cell Culture / P. Hossler, S.F. Khattak, Z.J. Li // *Glycobiol.* — 2009. — V. 19 — N. 9. — P. 936—949.
13. Yu, M. Production, characterization and pharmacokinetic properties of antibodies with N-linked mannose-5 glycans / M. Yu, D. Brown, C. Reed, S. Chung, J. Lutman, E. Stefanich, A. Wong, J.P. Stephan, R. Bayer // *MAbs.* — 2012. — V. 4 — N. 4. — P. 475—487.

A.N. MOROZOV\*, Z.V. ZAKHAROV, R.A. KOCHELABOV,  
D.V. TYUPA, A.V. ISERKAPOV, R.I. FARSIEVA,  
and M.A. SMOLOV

The International Biotechnology Center *Generium* LLC, 601125,  
Volginsky settl., Petushinskii region, Vladimirskaya oblast Russia

*e-mail:* morozov@ibcgenerium.ru

### Optimization of Perfusion Rate Acceleration is a Key Stage in Development of Highly Productive Perfusion Cultivation of CHO Cells

The influence of perfusion rate at the early phase of continuous cultivation on growth characteristics of CHO cells produ-

cing the therapeutic IgG1 and on the glycan profile of the produced MAb has been examined. It was established that non-optimal perfusion acceleration values caused some deviations from the normal transition of the cell culture to a steady-state phase of the process. For example, an excessive acceleration rate resulted in exceeding the maximum cell concentration that can be supported by cell culture medium. The cell growth was therefore limited and their viability dramatically decreased. The further recovery of growth and viability took a few days and reduced the economic efficiency of the process. Too low perfusion acceleration rate caused metabolic modifications in cell culture that affected its specific productivity and the quality of the synthesized protein. In particular, we observed the decrease in the target MAb fucosylation that could have a negative effect on the protein safety profile. In addition, the proliferation rate slowed down and cell volume increased by 2—2.5 times.

*Key words:* bioreactor, CHO cells, glycosylation, optimization, perfusion, perfusion acceleration.

*Biotekhnologiya (Biotechnology), 2016, V. 32, N 4, P. 60—67.*

---

\* Author for correspondence.