

УДК 602.6:612

Д.В. ЧАЩИНОВА, Н.В. СТРАТОНОВА\*, К.Е. ЛАПШИН, А.С. ЛИСОВ

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

e-mail: stratonova@ibcgenerium.ru

## Разработка промышленного способа культивирования продуцента рекомбинантного тканевого активатора плазминогена человека

Разработан перфузионный процесс промышленного культивирования клеточной линии *CHO* 1F8 — продуцента рекомбинантного тканевого активатора плазминогена человека, позволяющий получать целевой белок с характеристиками (удельная активность, содержание одноцепочечной формы и профиль гликозилирования), которые соответствуют требованиям Европейской фармакопеи. Разработанный процесс обеспечивает получение в биореакторе объемом 100 л за один производственный цикл  $38 \pm 3$  г рТАП, что соответствует 750 дозам препарата.

*Ключевые слова:* клетки *CHO*, перфузия, рекомбинантный тканевый активатор плазминогена.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-4-75-80

Технология получения рекомбинантного тканевого активатора плазминогена (рТАП) в клетках *CHO* существует уже несколько десятилетий и занимает крупный сегмент биотехнологического рынка [1]. Преимуществами рТАП, получаемого в клетках *CHO*, являются возможность его производства в больших объемах и удешевление препарата. рТАП экспрессируется в клетках *CHO* в одно- и двухцепочечной форме и может обладать двумя типами гликозилирования [2]. Данные параметры качества влияют на фармакокинетику и активность препарата и регламентированы в соответствующей монографии Европейской фармакопеи [3]: содержание одноцепочечной формы в субстанции рТАП должно составлять не менее 60%;

содержание молекул с первым и вторым типом гликозилирования должно варьировать в пределах 45—65% и 35—55%, соответственно. Данные параметры качества рТАП обеспечиваются прежде всего условиями культивирования, и поэтому разработка соответствующей технологии для получения больших объемов отечественного препарата рТАП, удовлетворяющего современным требованиям качества, является актуальной задачей.

Технология коммерческого производства рТАП, разработанная компанией Genentech (в настоящий момент лицензия на производство принадлежит компании Boehringer Ingelheim), основана на периодическом процессе культивирования суспензионной культуры рекомбинантных клеток

Чащинова Дарья Владимировна, Стратонова Наталия Валерьевна, Лапшин Константин Евгеньевич, Лисов Антон Сергеевич.

*Список сокращений:* ГФ-ВЭЖХ — гель-фильтрационная высокоэффективная жидкостная хроматография; ИФА — иммуноферментный анализ; КЖ — культуральная жидкость; МЕ — международная единица активности рТАП; рТАП — рекомбинантный тканевый активатор плазминогена.

\* Автор для переписки.

*CHO* с амплифицированным геном рТАП в стальных биореакторах объемом до 10000 л [4]. Для уменьшения объема биореактора и повышения продуктивности было предложено культивирование продуцента рТАП в режиме перфузии. Перфузионное культивирование адгерантных линий *CHO* осуществляли с помощью микроносителей из желатина, декстрана [5] и микроносителей с коллагеновой матрицей [4]. Применялись также перфузия на полых волокнах и камеры с керамическим матриксом для иммобилизации клеток. Однако эти методы культивирования не нашли применения в промышленности [4].

Более успешным оказалось перфузионное культивирование с использованием спинфильтров. Плотность культуры при скорости перфузии 4 объема реактора в сутки составляла 10 млн. кл/мл, в то время как при периодическом процессе только 2 млн. кл/мл; при этом во втором случае продукция рТАП была в 15—18 раз выше, чем в первом [4]. Появление перфузионной системы ATF сделало возможным культивирование суспензионных культур в режиме перфузии в современных одно-разовых биореакторах объемом до 1000 л.

Целью настоящей работы была разработка технологического процесса высокоэффективного промышленного культивирования продуцента рТАП с использованием перфузионной системы ATF для получения отечественного препарата, соответствующего Европейской фармакопее по удельной активности, содержанию одно- и двухцепочечной формы и профилю гликозилирования.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе был использован клон *CHO* 1F8 — продуцент рТАП, описанный в патенте [6]. Лабораторное культивирование клона проводили в биореакторе Biostat Vplus (Sartorius Stedim Biotech, Германия) объемом 3 л и перфузионной системе ATF2 (Repligen, США) при температуре 37°, скорости перемешивания 250 об/мин в питательной среде SFM4CHO (GE, США). Стартовая концентрация клеток составляла 0,3 млн. кл/мл. Перфузию начинали на 72-м часу культивирования. В ходе процесса определяли концентрацию клеток (в счетной камере Фукса-Розенталя), жизнеспособность культуры (методом исключения красителя трипанового синего), концентрацию глюкозы и лактата на анализаторе Biosen C-line EKF-Diagnostic, концентрацию и активность рТАП (см. ниже). Содержание  $O_2$  и  $CO_2$  в КЖ контролировали путем подачи этих газов в биореактор, поддерживая их давление на уровне  $70 \pm 20$  мм. рт. ст. и  $60 \pm 20$  мм. рт. ст., со-

ответственно. Культивирование в объеме 100 л проводили в одноразовом биореакторе SUB 100 Nucleo (Thermo Scientific, США) и перфузионной системе ATF6 (Repligen, США).

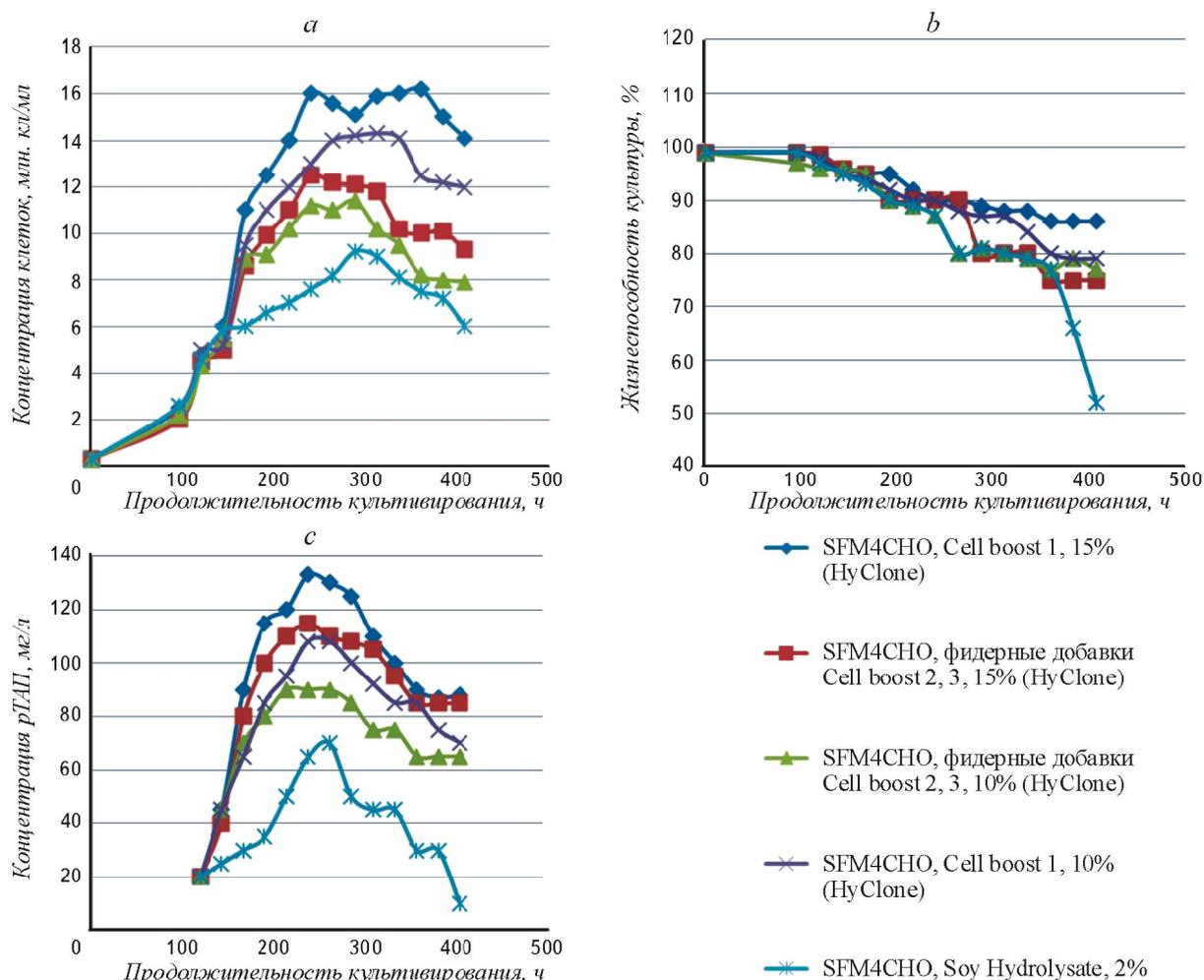
Концентрацию рТАП в перфузате определяли методом ИФА с использованием набора Assay-Sense Human tPA Chromogenic Activity kit (no. CT 1001, AssayPro, США); активность рТАП — методом лизиса фибринового сгустка согласно [3]. Содержание одно- и двухцепочечной формы мономера измеряли с помощью ГФ-ВЭЖХ (Alliance e2695 (Waters, США), TSK gel G3000SW 7,5×600 мм). Профиль гликозилирования рТАП анализировали методом ВЭЖХ (Alliance e2695 (Waters), TSK gel Amide-80, 150×2,0 мм). Для извлечения олигосахаридов использовали ферментативную обработку рТАП пептид-N-гликозидазой F. Для повышения чувствительности метода перед ВЭЖХ-анализом проводили дериватизацию олигосахаридов путем введения флуоресцирующей InstantAB® группы (ProZyme, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Подбор среды и режима перфузии

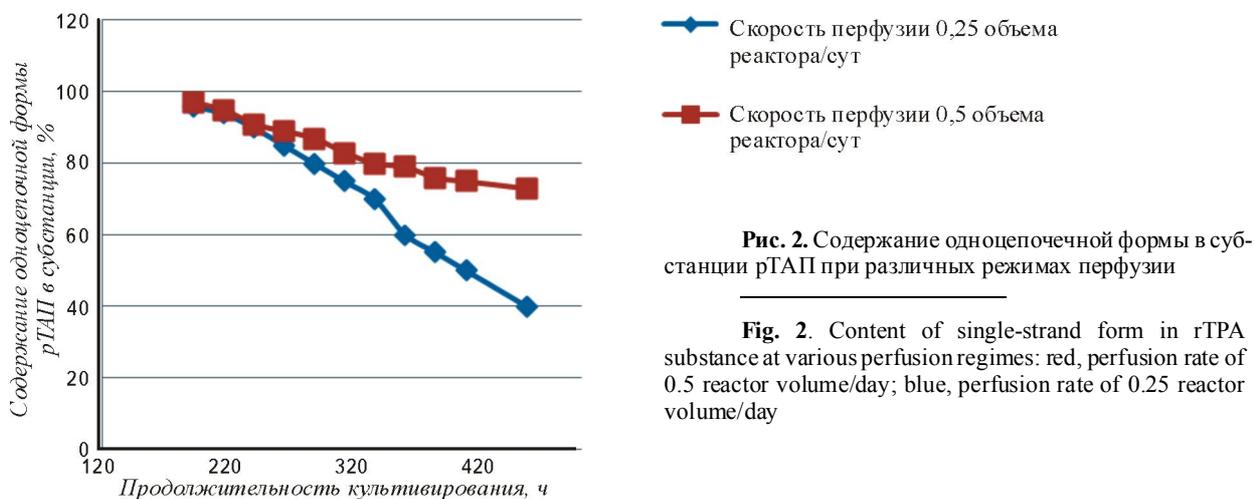
Для подбора оптимальной среды культивирования проводили выращивание клона *CHO* 1F8 с различными добавками. В процессе культивирования определяли концентрацию клеток, жизнеспособность культуры и продуктивность. Лучшие показатели были получены на среде SFM4CHO с добавлением 15% Cell Boost 1 (GE). Культура достигала значительной плотности клеток (рис. 1, А) и сохраняла высокую жизнеспособность (см. рис. 1, В), что позволяло достичь высокой концентрации рТАП в перфузате (см. рис. 1, С).

Для получения субстанции целевого белка с содержанием одноцепочечной формы не менее 60% и удельной активностью  $565 \pm 105$  тыс. МЕ/мг рТАП были исследованы различные режимы перфузии. Зависимость содержания одноцепочечной формы от кратности перфузии показана на рис. 2. Эффект увеличения кратности перфузии на качество целевого продукта связан с повышением скорости выведения рТАП из реактора и с ростом жизнеспособности культуры, так как, скорее всего, именно внутриклеточные протеазы, выделяющиеся при лизисе клеток, расщепляют одноцепочечную молекулу рТАП с образованием двухцепочечной формы.



**Рис. 1.** Культивирование клеток клона *CHO* 1F8 на среде SFM4CHO с различными добавками: *a* — концентрация клеток; *b* — жизнеспособность культуры; *c* — концентрация рТАП в перфузатах

**Fig. 1.** Culturing of CHO clone cells in SFM4CHO medium with various additives: *a*, cell concentration; *b*, culture viability; and *c*, concentration of rTPA in perfusates



**Рис. 2.** Содержание одноцепочечной формы в субстанции рТАП при различных режимах перфузии

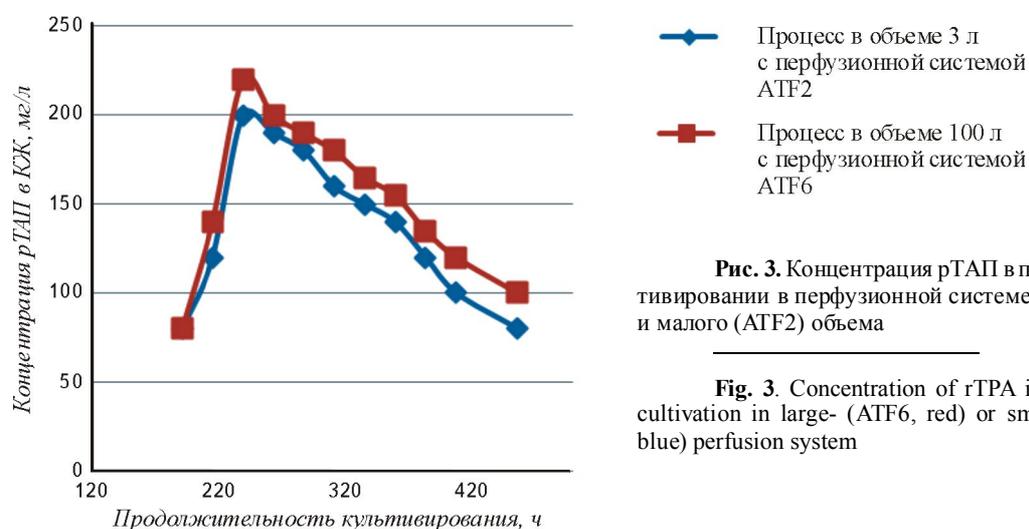
**Fig. 2.** Content of single-strand form in rTPA substance at various perfusion regimes: red, perfusion rate of 0.5 reactor volume/day; blue, perfusion rate of 0.25 reactor volume/day

**Выходные параметры процесса культивирования при различном рабочем объеме реактора**  
**Output parameters of culturing in reactors of various volumes**

Параметр Parameter	Объем, л Volume, L	
	3	100
Максимальная концентрация клеток, 10 <sup>6</sup> кл/мл Maximum cell concentration, 10 <sup>6</sup> cell/mL	17±2	16±2
Жизнеспособность в последние сутки процесса, % Viability on the last day of culturing, %	86±5	84±5
Продолжительность процесса, ч Time of culturing, h	456±24	456±24
Удельная активность целевого белка, тыс. МЕ/мг рТАП Specific activity of target protein, 10 <sup>3</sup> U/mg rTPA	610±40	600±40

Было проведено масштабирование процесса культивирования (параметров перфузии) от рабочего объема реактора 3 л до объема 100 л. Установлено, что продолжительность процесса, концентрация целевого белка в перфузате и культуральные показатели исходного процесса полностью воспроизводились в масштабированном процессе (табл. 1, рис. 3). При переходе от перфузионной системы ATF2 (3-л реактор) к ATF6 (100-л реактор) основными являлись следующие переменные характеристики: поток КЖ через одно волокно мембраны (определяет гидродинамические условия и величину механического воздействия на клетку), поток

фильтрата через единицу поверхности мембраны (отражает нагрузку на фильтр и потенциальный срок его работоспособности) и время пребывания клетки в системе ATF (показывает, как долго клетки находятся за пределами биореактора, и определяется объемным расходом системы ATF и соотношением между объемом диафрагменного насоса и общим объемом системы ATF). Эти параметры были определены в модельном процессе на ATF2 и воспроизведены в процессе с ATF6 (табл. 2). Исходя из данных, полученных при масштабировании реактора от 3 л до 100 л и учитывая равную длину волокон перфузионных систем ATF2-6-10, при даль-

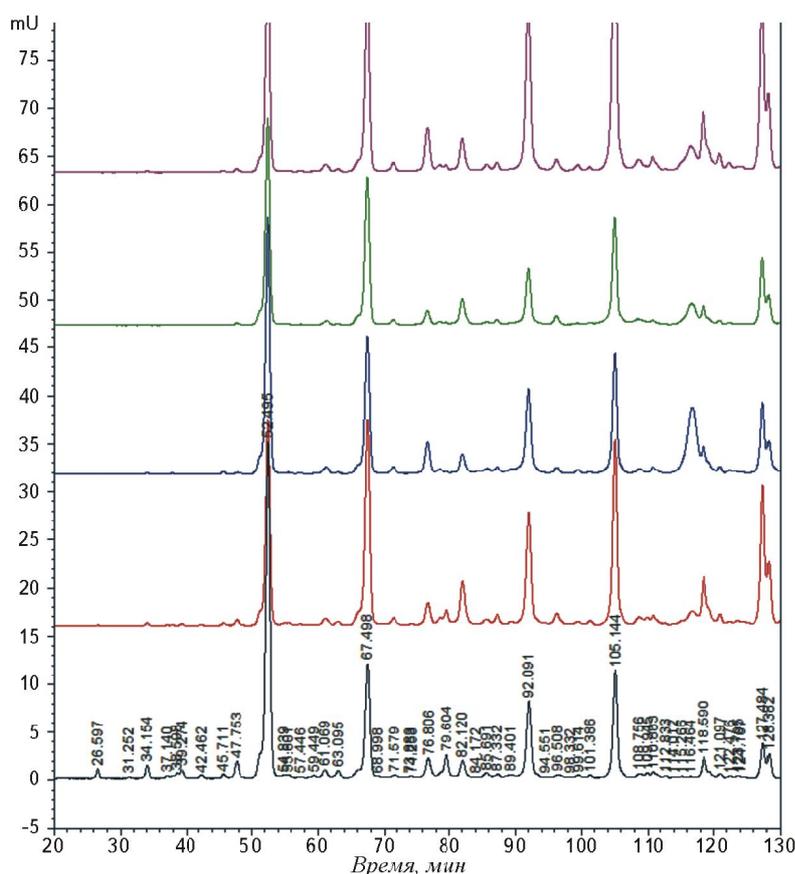


**Рис. 3.** Концентрация рТАП в перфузате при культивировании в перфузионной системе большого (ATF6) и малого (ATF2) объема

**Fig. 3.** Concentration of rTPA in perfusate during cultivation in large- (ATF6, red) or small-volume (ATF2, blue) perfusion system

**Изменение основных параметров процесса при переходе от перфузионной системы ATF2 к системе ATF6**  
**Changing of basic parameters of process during the transition from ATF2 to ATF6 perfusion system**

Параметр Parameter	ATF2	ATF6
Производительность, л перфузата/сут Productivity, L perfusate/day	1,5	50,0
Поток КЖ через одно волокно, мл/мин CL flow through a fiber, mL/min	12,0	12,0
Поток фильтрата через единицу поверхности мембраны, л/м <sup>2</sup> /ч Filtrate flow through a unit of membrane surface, L/m <sup>2</sup> /h	3,79	3,79
Время пребывания клетки в системе ATF, с Time of occurrence of a cell in ATF system, s	28,5	32,5



**Рис. 4.** Профиль гликозилирования рТАП, произведенного в объеме 3 л (розовая и зеленая кривые) и 100 л (синяя и красная кривые), в сравнении с соответствующими показателями для препарата Альтеплазе (черная кривая)

**Fig. 4.** Glycosylation profile of rTPA obtained in 3-L (pink and green curves) and 100-L (blue and red curves) reactor in comparison with corresponding characteristics of Alteplase preparation (black curve)

нейшем масштабировании процесса культивирования от объема 100 л до 1000 л будут установлены указанные значения параметров работы системы ATF.

Проведено исследование профиля гликозилирования рТАП, полученного в малом и большом объеме. В обоих случаях показано соответствие характеристик полученного рекомбинантного белка и коммерческого препарата Альтеплазе (Boehringer Ingelheim) (рис. 4) по содержанию основных гликанов.

Таким образом, разработан и масштабирован перфузионный процесс культивирования клона CHO 1F8 — продуцента рТАП. Целевой белок, получаемый в процессе, соответствует требованиям Европейской фармакопеи по удельной активности, содержанию одноцепочечной формы и профилю гликозилирования. Разработанный процесс позволяет получать за один производственный цикл в биореакторе объемом 100 л около 38 ± 3 г рТАП, что соответствует 750 дозам препарата.

Получено 21.07.16

**ЛИТЕРАТУРА**

1. *Carlos, J.-S.* Recombinant human tissue plasminogen activator: Thrombolysis in Pulmonary Embolism. — Switzerland: Springer Int. Pub., 2015. — P. 236.
2. *Walsh, G.* Tissue plasminogen activator-based thrombolytic agents: Directory of therapeutic enzymes [Ed. B.M. McGrath]. — Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, 2006. — P. 290.
3. Alteplase for injection, 07/2013:1170. European Pharmacopoeia 8.0, 2013. — P. 3639.
4. *Rouf, S.A.* Tissue-type plasminogen activator: characteristics, applications and production technology / S.A. Rouf, M. Moo-Young, and Y. Chisti // *Biotechnol. Adv.* — 1996. — V. 14. — P. 239—266.
5. *Nilsson, K.* Microcarrier culture of recombinant Chinese hamster ovary cells for production of human immune interferon and human tissue-type plasminogen activator / K. Nilsson, S. Birnbaum, and K. Mosbach // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 1988. — V. 27. — P. 366—371.
6. *Григорьева О.В., Завальный М.А., Карпов А.П., Петров А.В., Фабричный И.П., Шустер А.М.* Рекомбинантная плазмидная ДНК РВК415, кодирующая полипептид рекомбинантного тканевого активатора плазминогена человека, линия клеток *Cricetulus griseus* CHO 1F8 — продуцент рекомбинантного тканевого активатора плазминогена человека и способ получения и выделения полипептида, обладающего активностью тканевого активатора плазминогена // Патент РФ 2500817 C1, C12N 15/11, C12N 15/63, C12N 5/10, C12P 21/02. 2012.  
*Grigorieva, O.V., Zaval'nyi, M.A., Karpov, A.P., Petrov, A.V., Fabrichnyi, I.P., and Shuster, A.M.* Recombinant plasmid DNA that encodes a polypeptide of human recombinant tis-

sue plasminogen activator, cell line *Cricetulus griseus* CHO 1F8, a producer of human tissue plasminogen activator and method for obtaining and isolation of a polypeptide that has the activity of tissue plasminogen activator // Patent RU 2500817 C1, C12N 15/11, C12N 15/63, C12N 5/10, C12P 21/02. 2012.

D.V. CHASHCHINOVA, N.V. STRATONOVA\*,  
K.E. LAPSHIN, and A.S. LISOV

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

*e-mail:* stratonova@ibcgenerium.ru

**Development of a Method for Industrial Cultivation of a Producer of Human Recombinant Tissue Plasminogen Activator**

An industrial perfusion method for culturing of the CHO 1F8 cell line, a producer of human recombinant tissue plasminogen activator, has been developed. It permits to obtain a product that meets the requirements of the European Pharmacopoeia in respect of specific activity, content of the single-strand form and glycosylation profile. The suggested method makes it possible to obtain  $38 \pm 3$  g rTPA, or 750 doses of drug per cycle in a 100-L bioreactor.

*Key words:* human recombinant tissue plasminogen activator, CHO cell line, perfusion.

*Biotechnologiya (Biotechnology), 2016, V. 32, N 4, P. 75—80.*

---

\* Author for correspondence.

Reg. № 1306 от 28.06.99

Выдано Министерством печати РФ

Издатель: Федеральное государственное унитарное предприятие  
Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов  
(ФГУП ГосНИИгенетика)

Сдано в набор 28.07.16. Подписано в печать 16.09.16 Формат бумаги 60 × 88 1/8  
Бумага офсетная. Офсетная печать. Усл. печ. л. 10. Уч.-изд. л. 10,18. Усл.-кр. отт. 10,04. Тираж 250 экз.

---

Заказ № 1175

Отпечатано с готового оригинала-макета в ООО "Типография Гарт"  
105082, Москва, М. Почтовая, 12