

## Системный анализ, математическое моделирование и информационные системы

УДК 573.6

### Оптимизация условий лабораторного культивирования клеток СНО для получения генно-инженерного фолликулостимулирующего гормона человека

© 2018 Д.М. ПАВЛЕНКО<sup>1,2,\*</sup>, Т.Б. КАРЯГИНА<sup>1</sup>, Е.А. ГУКАСОВА<sup>1</sup>, Н.Е. ОРЕХОВА<sup>1</sup>, В.И. ШВЕЦ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ), Москва, 117997

<sup>2</sup>Московский технологический университет, Москва, 119454

e-mail: tovmolotov@gmail.com\*

Поступила 10.04.2017 г.

Принята в печать 16.11.2017 г.

Проведена оптимизация условий культивирования в биореакторе клеточной линии СНО, производящей фолликулостимулирующий гормон. Многофакторный эксперимент с четырьмя значениями температуры (36,6 °С, 37,5, 35,0 и 34,0 °С), четырьмя значениями рН (7,7, 7,4, 7,1 и 6,8) и тремя значениями DO (85, 50 и 30) использовали для оптимизации процесса биосинтеза ФСГ. Оптимизацию проводили в несколько этапов; значения оптимизируемых параметров для каждого нового этапа выбирали на основании предсказаний математической модели. С помощью такого метода удалось подобрать условия, при которых продуктивность клеточной линии повысилась в 3,5 раза по сравнению с первоначальными условиями, при этом удельная скорость роста клеток не изменилась. Помимо удельной скорости роста и специфической продуктивности были рассмотрены также удельная скорость образования лактата и потребления глюкозы, а также удельная скорость гибели клеток, рассчитанная по аналогии со скоростью роста.

*Ключевые слова:* биореактор, клеточные культуры, оптимизация, СНО.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-1-73-80

В настоящее время для производства лицензируемых фармпрепаратов помимо традиционных способов химического и микробного синтеза широко используют также методы с применением клеточных систем. Эти процессы значимы не только как инструмент промышленного производства, но и как поле для реализации прикладных и теоретических разработок.

Белки получают в разных экспрессионных системах, хотя клеткам млекопитающих отдают предпочтение из-за того, что в них осуществляются посттрансляционные модификации, необходимые для нормального функционирования терапевтических белковых препаратов [1]. Эти системы остаются конкурентоспособными несмотря

на высокие затраты на их применение для производства лекарственных препаратов, более низкую скорость роста клеток млекопитающих и меньшую их устойчивости к гидродинамическому стрессу по сравнению с клетками прокариот. Для нивелирования некоторых из этих негативных факторов при культивировании эукариот в биореакторах большое внимание уделяют аппаратным модификациям и выбору способа культивирования [2].

При производстве белка на основе клеток млекопитающих необходимым условием является создание клеточной линии. Оптимизация на этом этапе осуществляется за счет использования новых подходов к созданию векторов, а также

*Список сокращений:* ИПЖК – интегральная плотность жизнеспособных клеток; КЖ – культуральная жидкость; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; DO – содержание растворенного кислорода.

применения современных технологий трансфекции и скрининга, ускоряющего отбор стабильных клонов с высокой продуктивностью [3].

На этапе культивирования отобранных клонов увеличение продуктивности и обеспечение необходимого качества продукта достигается за счет подбора сред и добавок. Состав коммерческих специализированных сред не является общедоступным. Выбор сред основан на балансе между ростом и продуктивностью клеток с учетом экономической целесообразности процесса.

Кроме того, для оптимизации культивирования и масштабирования до уровня биореактора важную роль играет выявление и контроль критических параметров процесса. Увеличение эффективности возможно путем анализа влияния на процесс каждого параметра (содержание растворенного кислорода, pH и температура) по отдельности [4, 5]. Однако, при таком подходе не учитывается возможное взаимное воздействие оптимизируемых параметров, что может приводить к нахождению «ложного оптимума», а обеспечивающие наибольшую эффективность условия остаются неопределенными [6]. Избежать подобной ложной оптимизации предлагается с помощью многофакторного метода.

Многофакторный эксперимент используют во многих областях для решения таких задач, как разработка новых и улучшение уже существующих продуктов и процессов; скрининг значимых факторов; минимизация стоимости продукта; тестирование устойчивости процессов и продуктов и др.

Потребность в применении данного метода существует и на всех этапах биофармацевтического производства, таких как разработка и получение продукта, скрининг и аналитика, а также клинические исследования.

Целью данной работы было использование многофакторного эксперимента для оптимизации условий культивирования клеточных культур млекопитающих в биореакторе на основе минимального количества экспериментов и при учете взаимного влияния параметров процесса.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Клеточная культура и среда

В работе использовали продуцирующую ФСТ суспензионную клеточную линию CHO huFSIK, созданную на базе опытного биотехнологическо-

го производства ИБХ и депонированную в Российской коллекции клеточных культур позвоночных (РККК 744Д) ([http://www.cytspb.rssi.ru/rkkk/rkkk\\_ru.htm](http://www.cytspb.rssi.ru/rkkk/rkkk_ru.htm)) [7]. Для выращивания клеток использовали бессывороточную среду Ex-cell CHO DHFR (Sigma) с добавлением 1% (на этапе подготовки инокулята) или 2% (при культивировании в биореакторе) глутамина (Invitrogen).

### Получение инокулята культуры клеток CHO

Клетки культивировали в инкубаторе (Sanyo, Япония) при 37 °С в присутствии 5% CO<sub>2</sub> («Газ-Аналит», Россия) в газовой фазе с использованием флаконов с рабочим объемом 5 мл и 50 мл на круговой качалке (Biosan, Латвия) со скоростью 120 об/мин. Начальная плотность суспензии составляла 3·10<sup>5</sup> кл/мл. Пересадку культуры производили каждые 84±12 ч. Подготовленный инокулят с жизнеспособностью не менее 95% переносили в биореактор с мешалкой объемом 2 л (New Brunswick Sci.), обеспечивая начальную плотность культуры 3·10<sup>5</sup> кл/мл.

### Культивирование в биореакторе

Дальнейшее культивирование проводили в биореакторе с мешалкой (см. выше) при рабочем объеме 0,5 л и скорости перемешивания 80 об/мин. pH регулировали подачей 7,5%-ного гидрокарбоната натрия (Sigma-Aldrich, США) и углекислого газа («Газ-Аналит»). DO поддерживали автоматической подачей воздуха со скоростью 0–0,5 л/мин или азота («Газ-Аналит») в ручном режиме. Пробы отбирали ежедневно с фиксацией точного времени отбора для последующего расчета плотности, жизнеспособности клеток и содержания продукта, глюкозы и лактатов.

### Аналитические методы

Плотность и жизнеспособность клеток определяли в гемоцитометре («Минимед», Россия) с окрашиванием трипановым синим (Invitrogen, США). Содержание ФСТ в КЖ определяли методом иммуноферментного анализа с помощью коммерчески доступных наборов (DRG Instruments, Германия) на планшетном спектрофотометре (Statfax 2100, США) при длине волны 450 нм с двумя повторностями для каждой пробы и стандарта. Расчет проводили по калибровочной кривой, построенной методом четырехпараметрической логистической регрессии<sup>1</sup>. Содержание

<sup>1</sup>R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 2017.

глюкозы и солей молочной кислоты определяли при помощи коммерчески доступных биохимических наборов («Ольвекс», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя на планшетном спектрофотометре (Statfax 2100) при длине волны 492.

### Проведение оптимизации стадии культивирования и расчеты

Оптимизацию проводили постадийно методом факторного эксперимента с дробными репликами по следующим параметрам: содержание растворенного кислорода, рН и температура. Для каждого эксперимента был выбран свой набор значений данных условий. В расчетах учитывали данные трех экспериментов, проведенных в ранее выбранных условиях, принятых за исходные [8].

После постановки экспериментов проводили расчет специфической и относительной продуктивности по целевому продукту с использованием ИПЖК в соответствии с [8]. Для расчетов использовали также удельную скорость роста и рассчитанную на основе ИПЖК удельную скорость образования солей молочной кислоты и потребления глюкозы. Далее в программе SAS JMP v.8 методом наименьших квадратов находили коэффициенты многофакторной модели зависимости вышеуказанных показателей от условий проведения процесса (DO, T, рН), которая описывается уравнением вида:

$$ОП = aDO + bрН + cT + dDO \cdot рН + eDO \cdot T + fрН \cdot T + g,$$

где ОП, DO и T – относительная продуктивность, содержание растворенного кислорода и температура, соответственно;  $a-g$  – коэффициенты модели, определяемые в ходе расчета.

На первом этапе оптимизации ввиду недостаточного для расчета по вышеприведенной формуле количества экспериментов использовали упрощенное уравнение вида:

$$ОП = aDO + bрН + cT.$$

На основе предсказаний, полученных при помощи этой модели, выбирали еще два набора параметров эксперимента (DO, рН и температура) для следующего этапа оптимизации. Проведение экспериментов заканчивали в случае получения достаточного количества данных для построения адекватной модели (коэффициент детерминации  $> 0,99$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Начальные данные для оптимизации были получены в ходе трех параллельных экспериментов (расчеты по каждому из них проводили отдельно, и в математической модели они фигурировали как три отдельные экспериментальные точки) в биореакторе при следующих исходных условиях: температура 36,6 °С, DO=50% от насыщения воздухом и рН=7,4 [8]. Такие параметры культивирования, как скорость вращения мешалки (80 об/мин), режим подачи газов (воздух в объеме от 0 до 0,5 л/мин), начальный объем культуры (0,5 л) и плотность засеваемых клеток ( $3 \cdot 10^5$  кл/мл) в ходе экспериментов не изменяли.

Температура – один из важных факторов, влияющих на жизнеспособность клеток и их продуктивность. При культивировании клеток млекопитающих физиологическим значением температуры является 37 °С. Существует большое количество исследований, в которых показано, что понижение температуры до 32–33 °С приводит к увеличению продуктивности, снижению скорости роста и повышению жизнеспособности культуры клеток СНО [9–11]. Однако есть и работы, в которых при понижении температуры не зафиксировано увеличение продуктивности культуры [12]. При этом стоит заметить, что экспериментальных данных о воздействии на клетки температуры выше 37 °С крайне мало, в связи с чем невозможно сделать однозначные выводы о влиянии таких температур на характеристики культуры. В связи с этим на первом этапе оптимизации были протестированы значения температуры на 1,6 °С ниже и на 0,9 °С выше, чем в традиционном процессе (табл. 1).

Как и температура культивирования, рН КЖ оказывает существенное влияние на рост, метаболизм и продукцию белка. Оптимальные значения рН различны для разных культур. Высокая продуктивность может наблюдаться как при относительно высоких значениях рН (7,6–8,0) [13], так и при более низких (6,8–7,0) [14]; на некоторые культуры изменение рН в довольно широком диапазоне не оказывает заметного влияния [15]. Для поиска оптимального для данного процесса значения был выбран шаг в 0,3 единицы рН.

Меньше изучено влияние DO на процесс культивирования. Показано, что оптимальные условия для продукции белка могут отличаться от таковых для роста клеток. Как высокие, так и низкие значения DO могут ингибировать рост клеток, а наибольшее количество целевого продукта часто

Таблица 1

**Параметры для трех этапов оптимизации процесса культивирования клеток CHO в биореакторе**

**Parameters of three optimization stages of CHO cells culturing in bioreactor**

Этапы оптимизации и их варианты	DO, %	pH	T, °C
Традиционные условия культивирования	50	7,4	36,6
<i>1-й этап</i>			
1	30	7,7	37,5
2	85	7,1	37,5
3	85	7,7	35,0
4	30	7,1	35,0
<i>2-й этап</i>			
5	30	7,7	34,0
6	85	7,1	34,0
<i>3-й этап</i>			
7	85	6,8	34,0
8	30	6,8	34,0

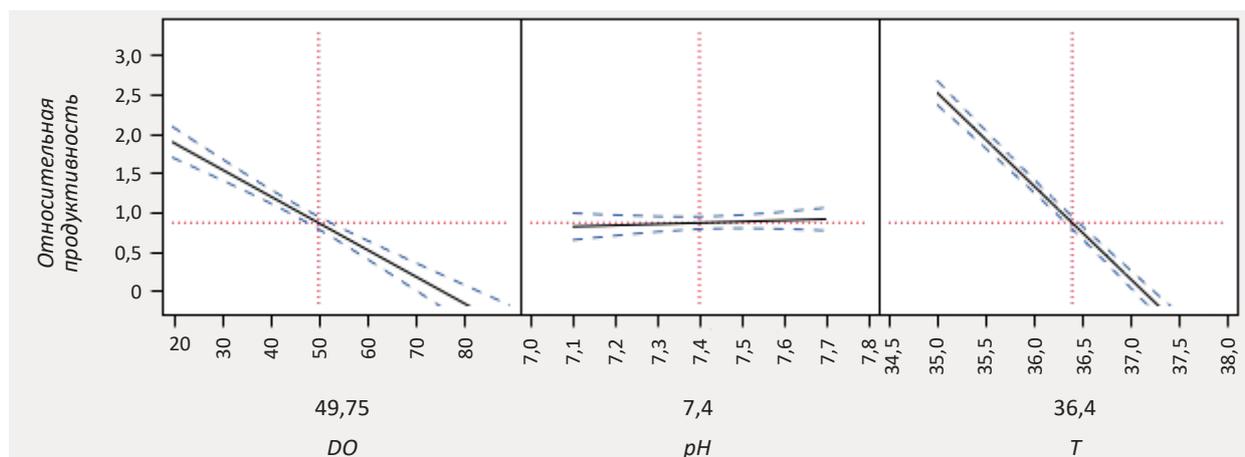
наблюдается в диапазоне 30–40% от насыщения воздухом [16]. Однако есть и публикации, в которых указывается положительное влияние на гликозилирование белка уровня DO, равного 50–100% от насыщения воздухом [17,18]. В связи с этим для первого этапа выбраны значения DO 30% и 85% от насыщения воздухом (см. табл. 1).

В ходе четырех вариантов экспериментов первого этапа в качестве основного критерия эф-

фективности для регрессивной модели применяли относительную продуктивность. Во всех экспериментах оценивали также скорость роста и жизнеспособность клеток, объемную и удельную продуктивность, скорость поглощения глюкозы и образования солей молочной кислоты. Относительную продуктивность по целевому продукту (удельная продуктивность в эксперименте, соотношенная с удельной продуктивностью посевного материала, используемого в данном эксперименте) рассчитывали с использованием ИПЖК в соответствии с [8]. При построении графика по каждому из параметров два другие были зафиксированы и принимали среднее значение.

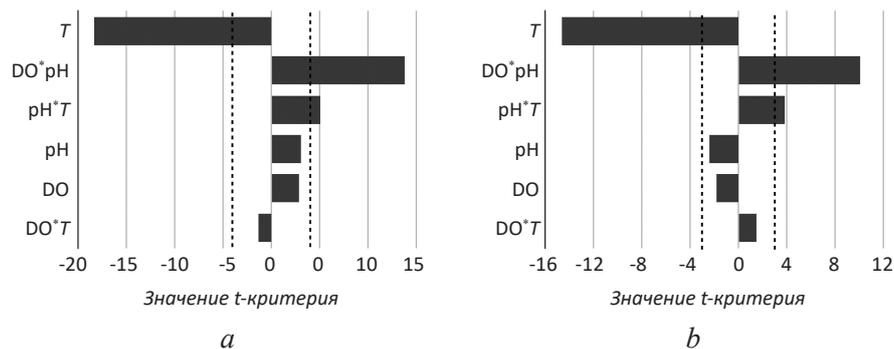
В ходе первичных экспериментов регрессионная модель (по упрощенному уравнению) показала наибольшее влияние температуры на относительную продуктивность культуры CHO (рис. 1).

Влияние двух других параметров (pH и DO) на уровень относительной продуктивности культуры оказалось незначимым ( $p > 0,05$ ). Такие результаты согласуются с опубликованными ранее данными о том, что снижение температуры приводит к увеличению продуктивности клеток CHO [10–12]. Но при этом, в отличие от литературных данных, в наших экспериментах падение скорости роста клеток в исследуемом нами диапазоне температур оказалось незначимым ( $p > 0,05$ ). В связи с этим для следующего этапа эксперимента выбрали два набора параметров с более низким значением температуры – 34 °C (см. табл. 1).



**Рис.1.** Зависимость относительной продуктивности клеток CHO, прогнозируемой многофакторной моделью, от параметров проведения процесса. Точечным пунктиром обозначены точки средних значений параметров; величина среднего значения по каждому параметру указана под осью абсцисс

**Fig. 1.** Dependency of relative productivity of CHO cells predicted by the multifactorial model on parameters of the process. Dotted lines designate median values of parameters; median value for each parameter is given under the X axis



**Рис.2.** Воздействие отдельных факторов и их комбинаций на продуктивность клеток СНО в эксперименте: *a* – 2-й этап; *b* – 3-й этап. Пунктиром обозначены границы, в пределах которых различия считаются случайными ( $p > 0,05$ )

**Fig. 2.** Effect of individual factors and their combinations on productivity of CHO cells: (*a*), 2<sup>nd</sup> stage; (*b*), 3<sup>rd</sup> stage. Dotted lines flank boundaries within which differences are considered random ( $p > 0,05$ )

Многофакторный анализ на 2-м этапе (рис. 2*a*), выполненный уже с использованием полной модели, подтвердил значимость температуры ( $p < 0,05$ ) и выявил влияние членов уравнения, отражающего совместный эффект DO и pH, а также T и pH на продуктивность клеток СНО (накопление ФСГ).

Схема оптимизации предусматривает проведение дополнительных экспериментов с более низкими или более высокими значениями параметров. Выявленное на втором этапе совместное влияние DO и pH свидетельствовало о необходимости для следующей серии экспериментов изменить значение одного из этих параметров. Дальнейшее снижение температуры было признано нецелесообразным ввиду четко установленного негативно-го влияния такого снижения на продуктивность. На основании литературных данных можно заключить, что увеличение подачи воздуха с целью повышения DO, вероятней всего, вызовет снижение жизнеспособности и скорости роста клеток [19]. В то же время значения DO ниже 30% от насыщения могут повлиять на изменение профиля гликозилирования [16]. Для следующей серии экспериментов следовало выбрать комбинации параметров либо с более низкими, либо более высокими значениями pH, так как и в том, и в другом случае существовала вероятность достижения более высокой продуктивности [13, 14]. Так как было выявлено совместное влияние pH и температуры (см. рис. 2*a*), а оптимальные значения температуры находятся на нижней границе исследованного диапазона, было принято решение провести эксперименты при снижении pH до 6,8 (см. табл. 1, 3-й этап). Полученные на этом этапе результаты (см. рис. 2*b*) не выявили никаких новых закономерностей, поэтому дальнейшие эксперименты с изменением параметров не проводили.

Модель зависимости продуктивности от DO, pH и T, рассчитанная на основе полученных данных, показала, что наиболее высокая продуктивность достигается при наиболее низких значениях всех параметров: DO – 30% от насыщения, pH – 6,8 и T – 34 °C. При таких условиях проведения процесса относительная продуктивность клеток была в 3,5 раза выше, чем при базовых (2,83 против 0,8) (табл. 2). Адекватность модели подтверждается высоким значением коэффициента детерминации (0,993).

По результатам проведенных экспериментов не удалось выявить четкой корреляции условий проведения процесса с параметрами, отражающими состояние клеток. Удельная скорость роста

Таблица 2

**Результаты экспериментов по культивированию клеток СНО в соответствии с тремя этапами оптимизации**

**Results of experiments on culturing of CHO cells according to three stages of optimization**

Вариант эксперимента*	Удельная продуктивность, мг/(млн. кл. ч)	Относительная продуктивность	Максимальная плотность клеток, млн.кл./мл
1	0,01580	0,269	3,59
2	0,00539	0,142	1,68
3	0,08520	1,340	2,46
4	0,13000	1,770	5,02
5	0,03830	0,796	4,53
6	0,09730	1,390	1,27
7	0,06550	1,580	1,55
8	0,12400	2,830	2,63

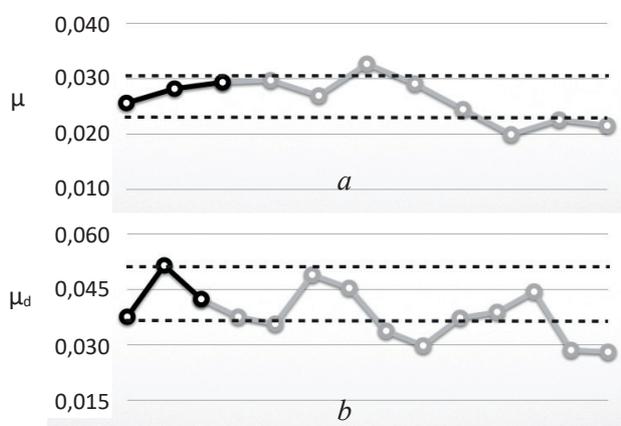
\*См. табл. 1

клеток показала высокую вариабельность уже при первоначальных условиях (рис. 3а), и значимые отличия наблюдали только в нескольких экспериментах с очевидно неблагоприятными условиями. Подобная же картина складывается и с удельной скоростью гибели клеток (рис. 3б).

Модель выявила зависимость только максимальной плотности жизнеспособных клеток от DO с оптимальным ее значением 30% от насыщения воздухом, т.е. на нижней границе параметра; влияние остальных параметров оказалось незначимым.

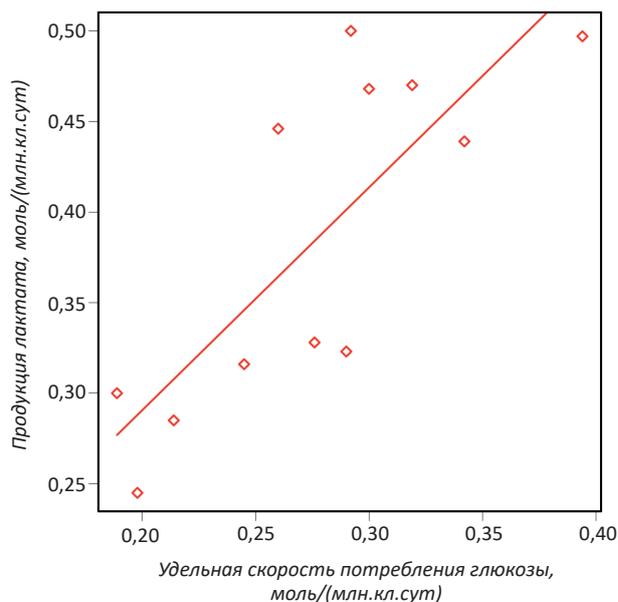
Многофакторный анализ не показал значимой зависимости удельной скорости накопления солей молочной кислоты и потребления глюкозы от какого-либо из параметров культивирования. Обнаружена только четкая корреляция между ними (рис. 4).

Полученные данные свидетельствуют о наличии двух дискретных уровней продукции соли молочной кислоты, между которыми нет промежуточных значений. Это наблюдение говорит о наличии двух стационарных состояний культуры [20]. Так как количество метаболических стационарных состояний у клеток CHO обычно больше двух, то можно предположить существование у использу-



**Рис. 3.** Вариабельность экспериментов по показателям роста (а) и гибели (б) клеток. Каждая точка соответствует значению параметра, полученного в отдельном эксперименте. Пунктиром обозначены пределы случайных колебаний, определенные на основе экспериментов, проведенных при одинаковых исходных условиях (выделены черным).  $\mu$  – удельная скорость роста клеток ( $ч^{-1}$ );  $\mu_d$  – удельная скорость гибели клеток ( $ч^{-1}$ )

**Fig. 3.** Variability of experiments in values of CHO cell growth (a) and death (b) characteristics. Each point corresponds to parameter value occurring in individual experiment. Dotted lines flank limits of random fluctuations determined in experiments with similar starting conditions (marked black).  $\mu$  is specific cell growth rate ( $h^{-1}$ );  $\mu_d$  is specific rate of cell death ( $h^{-1}$ )



**Рис. 4.** Взаимозависимость удельной скорости потребления глюкозы и продукции лактата клетками CHO

**Fig. 4.** Interdependence of specific rates of glucose consumption and lactate production by CHO cells

емой нами культуры CHO состояния с еще меньшим образованием соли молочной кислоты, и, следовательно, более эффективным метаболизмом и большей продуктивностью. В ходе оптимизации условий культивирования в биореакторе это состояние выявить не удалось; следовательно, дальнейшие усилия по разработке процесса должны быть направлены на другие средства повышения эффективности, например, на подбор среды культивирования в периодическом режиме с подпиткой.

Таким образом, многофакторный метод в биореакторе успешно использован для оптимизации условий культивирования клеточной линии CHO: продукцию ФСГ удалось повысить в 3,5 раза. Предлагаемый метод, являющийся приложением факторного эксперимента с дробными репликами, позволил при проведении небольшого количества опытов получить информативную картину влияния условий культивирования на показатели эффективности изучаемого процесса.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Butler M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied Microbiol. Biotechnology*. 2005. 68(3). 283–291. doi: 10.1007/s00253-005-1980-8.
2. Omasa T., Onitsuka M., Kim W.-D. Cell engineering and cultivation of chinese hamster ovary (CHO) cells. *Curr Pharm Biotechnol*. 2010. 11(3). 233–240. doi: 10.2174/138920110791111960

3. Bandaranayake A.D., Almo S.C. Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Letters*. 2014. 588(2). 253–260. doi: 10.1016/j.febslet.2013.11.035
4. Ozturk S.S., Palsson B.O. Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 2. Effects of serum concentration, dissolved oxygen concentration, and medium pH in a batch reactor. *Biotechnol. Prog.* 1991. 7(6). 481–494. doi: 10.1021/bp00012a002
5. Tsao Y.S., Cardoso A.G., Condon R.G.G., et al. Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism. *J. Biotechnology*. 2005. 118(3). 316–327. doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.05.016
6. Handbook of industrial cell culture: mammalian, microbial, and plant cells [Ed. Vinci V.A., Parekh S.R.]. Totowa: Humana Press Inc., 2003.
7. Кирилова И.В., Карягина Т.Б., Павленко Д.М., и др. Клеточная линия huFSH1К, секретирующая рекомбинантный человеческий ФСГ. Патент РФ, 2502798, С 12 N 5/00, 2013.
8. Павленко Д.М., Карягина Т.Б., Гукасова Е.А., и др. Минимизация влияния случайных факторов при оценке специфической продуктивности в процессах культивирования продуцентов рекомбинантных белков. *Биофармацевтический журн.* 2012. 4(6). 13–16.
9. Fox S.R., Yap M.X., Yap M.G.S., et al. Active hypothermic growth: a novel means for increasing total interferon- $\gamma$  production by Chinese-hamster ovary cells. *Biotechnol. Applied Biochemistry*. 2005. 41(3). 265–272. doi: 10.1042/BA20040067
10. Sunley K., Tharmalingam T., Butler M. CHO cells adapted to hypothermic growth produce high yields of recombinant  $\beta$ -interferon. *Biotechnology Progress*. 2008. 24(4). 898–906. doi: 10.1002/btpr.9
11. Fan L., Zhao L., Ye Z., et al. Effect of culture temperature on TNFR-Fc productivity in recombinant glutamine synthetase-chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Letters*. 2010. 32(9). 1239–1244. doi: 10.1007/s10529-010-0318-5
12. Rössler B., Lübben H., Kretzmer G. Temperature: A simple parameter for process optimization in fed-batch cultures of recombinant Chinese hamster ovary cells. *Enzyme and Microbial Technology*. 1996. 18(6). 423–427. doi: 10.1016/0141-0229(95)00121-2
13. Borys M.C., Linzer D.I., Papoutsakis E.T. Culture pH Affects Expression Rates and Glycosylation of Recombinant Mouse Placental Lactogen Proteins by Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells. *Nat. Biotech.* 1993. 11(6). 720–724. doi: 10.1038/nbt0693-720
14. Kuwae S., Ohda T., Tamashima H., et al. Development of a fed-batch culture process for enhanced production of recombinant human antithrombin by Chinese hamster ovary cells. *J. Biosci. Bioengin.* 2005. 100(5). 502–510. doi: 10.1263/jbb.100.502
15. Osman J.J., Birch J., Varley J. The response of GS-NS0 myeloma cells to pH shifts and pH perturbations. *Biotechnol. Bioengin.* 2001. 75(1). 63–73. doi: 10.1002/bit.1165
16. Link T., Bäckström M., Graham R., et al. Bioprocess development for the production of a recombinant MUC1 fusion protein expressed by CHO-K1 cells in protein-free medium. *J. Biotechnol.* 2004. 110(1). 51–62. doi: 10.1016/j.jbiotec.2003.12.008
17. Chotigeat W., Watanapokasin Y., Mahler S., et al. Role of environmental conditions on the expression levels, glycoform pattern and levels of sialyltransferase for hFSH produced by recombinant CHO cells. In: Cell Culture Engineering IV: Improvements of Human Health [Ed. Buckland B.C., Aunins J.G., Bibila T.A., et al.]. Dordrecht: Springer. 1995. 217–221. doi: 10.1007/978-94-011-0257-5\_24
18. Restelli V., Wang M.-D., Huzel N., et al. The Effect of Dissolved Oxygen on the Production and the Glycosylation Profile of Recombinant Human Erythropoietin Produced From CHO Cells. *Biotechnol. Bioengin.* 2006. 94(3). 481–494. doi: 10.1002/bit.20875.
19. Chisti Y. Animal-cell damage in sparged bioreactors. *Trends in Biotechnology*. 2000. 18(10). 420–432. doi: 10.1016/S0167-7799(00)01474-8.
20. Deshpande R., Yang T.H., Heinzele E. Towards a metabolic and isotopic steady state in CHO batch cultures for reliable isotope-based metabolic profiling. *Biotechnology J.* 2009. 4(2). 247–263. doi: 10.1002/biot.200800143.

# Optimization of Conditions for Laboratory Culturing of CHO Cells for Obtaining Gene-Engineered Follicle-Stimulation Hormone

D.M. PAVLENKO<sup>1,2,\*</sup>, T.B. KARIAGINA<sup>1</sup>, E.A. GUKASOVA<sup>1</sup>, N.E. OREKHOVA<sup>1</sup>, and V.I. SHVETS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*The Shemyakin-and-Ovchinnikov Institute for Bioorganic Chemistry (IBKh), Russ. Acad. Sci., 117997, Moscow Russia*

<sup>2</sup>*The Moscow University of Technology, 119454, Moscow Russia*

*e-mail: tovmolotov@gmail.com\**

Received April 10, 2017

Accepted November 16, 2017

**Abstract**—The conditions for culturing of CHO cell line producing the follicle-stimulating hormone in a bioreactor have been optimized. A multifactor experiment with four values of temperature (36.6 °C, 37.5, 35.0 and 34.0 °C), four values of pH (7.7, 7.4, 7.1 and 6.8) and three DO values (85, 50 and 30) were used. The optimization was performed in a few stages; the values of the optimized parameters for each stage were selected on the basis of the mathematical model predictions. This method permitted to select the conditions that provided the 3.5-fold increase in the cell line productivity as compared to the previously used conditions. The specific growth rate of the cells remained unchanged. Along with the specific growth rate and specific productivity, the specific rate of lactate formation and glucose consumption, and also the specific rate of cell death calculated by analogy with the growth rate were studied.

*Key words:* bioreactor, cell cultures, optimization, CHO.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-1-73-80