

УДК 60-7

Принцип оперативного выбора лидерных клонов-продуцентов моноклональных антител при создании стабильных клеточных линий на основе СНО

© 2019 С.С. ТИМОНОВА^{1,*}, В.И. ПАВЕЛКО¹, И.А. КИРИК¹, В.Н. БАДЭ¹, Т.О. МАЛЫГИНА², Р.А. ХАМИТОВ¹, А.А. ПИСКУНОВ¹

¹Международный биотехнологический центр «Генериум», пос. Вольгинский, Владимирская обл., 601125,

²ООО «Оптек ZEISS Group», 109028, Москва

*e-mail: timonova1993@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.02.2019 г.

После доработки 05.07.2019 г.

Принята к публикации 09.07.2019 г.

Описана биотехнологическая разработка моноклональных клеточных линий продуцентов терапевтического белка на основе клеток яичников китайского хомячка (СНО). Получены 24 клон-продуцента рекомбинантного моноклонального антитела, которые исследовали по ростовым и продуктивным характеристикам с использованием роботизированной системы Ambr Tap Biosystems (ambr[®]15). Система позволяет проводить культивирование продуцентов в условиях, близких к промышленным биореакторам. Роботизированная система ambr[®]15 состоит из 24 минибиореакторов (15 мл), которые позволяют исследовать одновременно 24 клон. Культивирование клонов проводили в режиме fed-batch. Волюметрическую продуктивность 24 клонов определяли методом ИФА. На 9-е сутки процесса культивирования она варьировала в пределах 120–450 мг/л. Показан общий принцип выбора лидерных клонов-продуцентов для дальнейших исследований.

Ключевые слова: клоны-продуценты, минибиореактор, Ambr Tap Biosystems, fed-batch, моноклональные антитела, культура клеток яичника китайского хомячка СНО.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-65-72

Для успешного создания лекарственного препарата на основе рекомбинантных моноАТ важной стадией является создание клеточной линии с высокой продуктивностью. От того, насколько тщательно проходит поиск продуцентов зависит качество будущего препарата и экономическая составляющая производства лекарственного средства.

В настоящее время продуценты моноАТ, как правило, получают на основе СНО. Эта культура клеток позволяет производить белки близкие к человеческим (посттрансляционные модифи-

кации, в том числе профиль гликозилирования и др.) [1, 2]. Продуцируемые ими антитела эффективны и безопасны при введении пациенту, поскольку большинство человеческих патогенных вирусов не реплицируются в СНО [3, 4].

Производство моноклональных антител является быстро развивающимся сегментом фармацевтической индустрии и составляет примерно треть всех биотехнологических продуктов. Современные препараты моноАТ применяются при лечении тяжелых хронических заболеваний, воспалительных и аутоиммунных – при ревматоидном

Список сокращений: ИФА – иммуноферментный анализ; КЖ – культуральная жидкость; моноАТ – моноклональные антитела; ambr[®]15 – роботизированная система Ambr Tap Biosystems; CCD – кумулятивная клеточная плотность; СНО – культура клеток яичника китайского хомячка; DO – растворенный кислород в культуральной среде (%); fed-batch – режим культивирования без смены среды с добавлением подкормок; ГАН – антитела козы, специфичные к иммуноглобулинам IgG человека; рГАН – антитела козы, специфичные к иммуноглобулинам IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена; VCD – концентрация жизнеспособных клеток.

артрите [5–7], бронхиальной астме [8–10], диабете и других заболеваний, а также в терапии онкологических заболеваний [11–13].

Получение клонов-продуцентов терапевтических моноАТ предполагает поэтапный процесс и включает следующие стадии.

I. Создание генно-инженерных конструкций, содержащих рекомбинантные гены моноАТ.

II. Создание моноклональной клеточной линии рекомбинантного моноАТ:

- трансфекция клеток линии СНО плазмидами;
- клонирование и отбор лидерных клонов-продуцентов;
- доказательство соответствия структуры моноАТ заданным свойствам;
- изучение стабильности (генетической, ростовых характеристик, продуктивности) лидерных кандидатов-продуцентов;

III. Оптимизация условий культивирования лидерных клонов-продуцентов.

На стадии выбора клон-продуцента существенную помощь в минимизации влияния человеческого фактора на результаты эксперимента оказывают стандартизация условий сравнения

кандидатов и автоматизация данного процесса [14]. Применение роботизированных систем облегчает решение выдвигаемых перед исследователем задач.

Для сравнения лидерных клонов-кандидатов в работе была использована роботизированная система минибиореакторов Ambr Tap Biosystems (ambr®15). Система имеет 24 минибиореактора и 8 технических платформ: две платформы для одноразовых наконечников (1 и 5 мл), две – для размещения крышек от рабочих планшет и уменьшения риска контаминации, и четыре рабочие платформы для отбора проб, добавления компонентов и т.д. (рис. 1). Ambr®15 располагается в ламинарном шкафу, что позволяет проводить эксперименты в стерильных условиях.

При сравнении ростовых и продуктивных характеристик клеточных линий клонов во время эксперимента необходимо контролировать температуру, рН, концентрацию растворенных газов в среде и др. Рабочий объем минибиореактора варьируется от 10–15 мл. Каждый минибиореактор оснащен механической лопастной мешалкой и датчиками рН и DO, фильтром для дополнительной

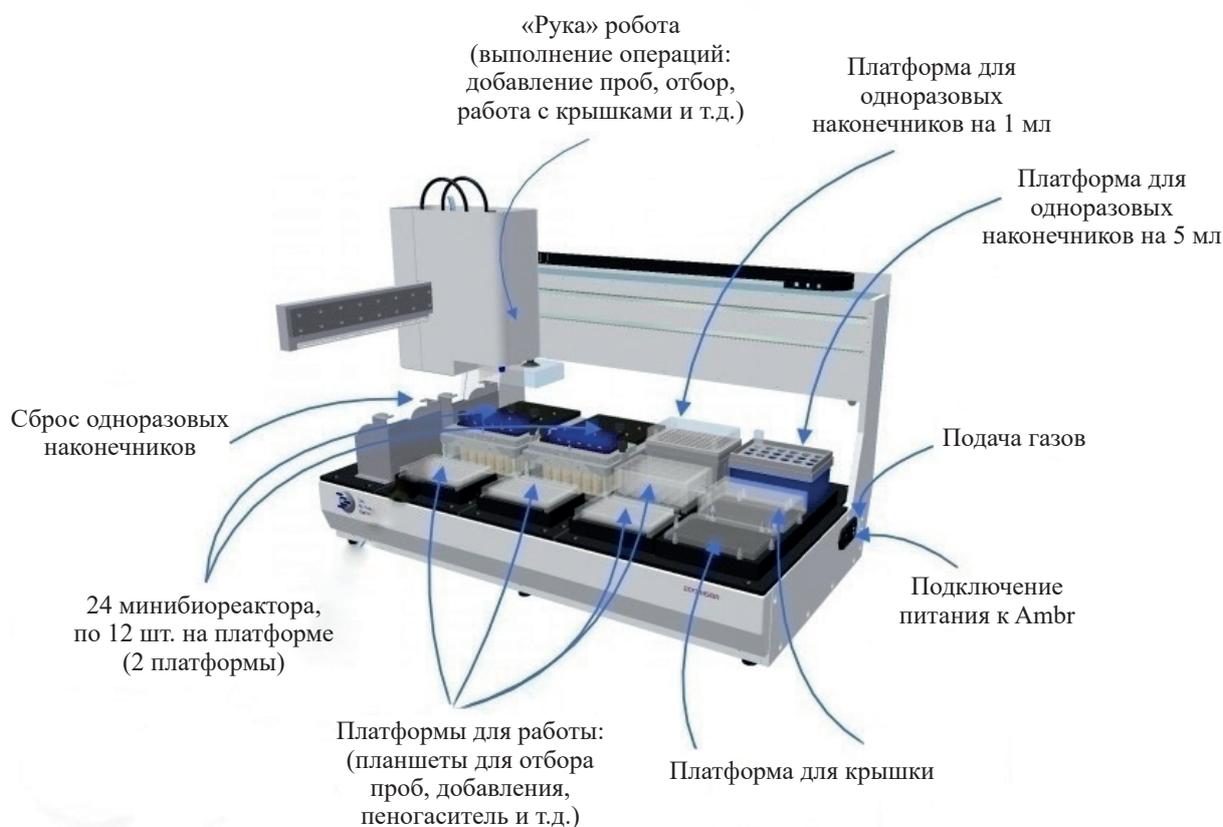


Рис. 1. Расположение платформ Ambr Tap Biosystems

Fig. 1. The ambr®15 cell culture workstation design

очистки воздуха и крышкой, закрывающей минибиореактор. Это позволяет работать с жидкостями: добавлять компоненты (подкормки, пеногасители, глюкозу и т.д.) и отбирать пробы в стерильных условиях (рис. 2). Таким образом, минибиореактор имитирует процесс культивирования в промышленном биореакторе и обеспечивает идентичные условия, оптимальные для роста культур клеток клонов-производителей.

Каждый биореактор ambr[®]15 имеет сенсорный датчик, измеряющий *DO*, и сенсорный датчик, измеряющий pH. Датчики работают по принципу возбуждения/излучения флуоресценции. Измерения *DO* и pH проходит в режиме реального времени каждые 90 с. Так как работа датчиков основана на флуоресценции, то некоторые компоненты в среде могут потенциально влиять на их работу. Производители рекомендуют использовать ростовую среду без фенолового красного, поскольку она имеет аналогичные длины волн возбуждения излучения по сравнению с флуоресцентными датчиками, которые могут повлиять на точность калибровочных кривых во время эксперимента (Experiment Guide Ambr Tap Biosystems). Контроль подачи кислорода в каждый минибиореактор позволяет поддерживать определенный уровень *DO*. Значение pH контролируется подачей углекислого газа (CO_2) в ростовую среду, которая смещает равновесие в карбонатно-бикарбонатной буферной системе в сторону образования угольной кислоты и, как следствие, снижает pH.



Рис. 2. Схема минибиореактора ambr[®]15

Fig. 2. Ambr[®]15 cell culture microbioreactor vessel

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Трансфекция клеточной линии СНО

Клетки исходной линии СНО-K1, адаптированной к суспензионному культивированию в средах, не содержащих сыворотку или других компонентов животного происхождения, были трансфицированы плазмидами, несущими гены целевого антитела моноАТ с резистентностью к селективному антибиотику. Селекция проводилась путем культивирования клонов на ростовой среде с добавлением антибиотика.

Определение титра целевого белка методом ИФА в ходе скрининга лидерных клонов-производителей

Концентрацию моноАТ, секретируемого клетками клонов-производителей в КЖ, определяли методом ИФА, используя Nunc MaxiSorp (Medisorb Microplates, США) с сорбированными на них антителами козы, специфичными к иммуноглобулинам IgG человека (ГАН, Cat #50728, ИМТЕК, Россия). В качестве окрашивающих антител использовали антитела козы, специфичные к иммуноглобулинам IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена рГАН, HRP, Cat #8667 (Sigma, США). В качестве стандарта использовали антитело известной концентрации.

Культивирование в режиме fed-batch

Для изучения ростовых характеристик и продуктивности клоны-производители моноАТ рассевали в минибиореакторы роботизированной системы ambr[®]15 и культивировали при следующих условиях: посевная плотность – $0,3 \cdot 10^6$ кл./мл; ростовая среда – 12 мл; $pH \leq 7,2$; $DO \geq 30\%$; температура +37 °С (без снижения); скорость ротационного вращения – 850 об/мин; подкормка (feed) – 5% от объема культивирования с 3-го по 7-й день включительно.

Отбор проб для подсчета клеток, титра моноАТ и количества метаболитов проводили каждый день, начиная с 3-го дня процесса культивирования. Контроль *DO* и pH осуществлялся системой ambr[®]15 автоматически, pH регулировался не выше 7,2 с помощью автоматической подачи газа CO_2 в каждый минибиореактор.

Изучение ростовых характеристик клонов-производителей

Плотность жизнеспособных клеток определяли в камере Фукса-Розенталя с использованием 0,1%-ного раствора трипанового-синего.

Нежизнеспособные клетки окрашивались в синий цвет, так как их мембрана становилась проницаемой для красителя. Жизнеспособность клеточной культуры вычисляли по формуле:

$$Viab = \frac{C_v}{C_t} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где $Viab$ – жизнеспособность культуры (%); C_v – концентрация живых клеток (кл./мл); C_t – общая концентрация клеток (кл./мл).

Кумулятивную клеточную плотность, вычисляли с помощью следующей формулы:

$$CCD_2 = 0,5(VCD_0 + VCD_1) \frac{T}{24} + CCD_1, \quad (2)$$

где CCD_2 – кумулятивная клеточная плотность в день отбора пробы; CCD_1 – кумулятивная клеточная плотность предыдущего дня отбора пробы; T – время (ч), между точками отбора проб в процессе культивирования (если $T=0$, CCD также равна нулю); VCD_0 – начальная плотность жизнеспособных клеток; VCD_1 – конечная плотность жизнеспособных клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В $ambr^{®}15$ были высеяны 24 моноклональные клеточные линии, экспрессирующие моноклональный антитело (АТ), для дальнейшего сравнения и отбора наиболее продуктивного и перспективного клона-продукта для масштабирования и наработки целевого белка. В ходе эксперимента моделировали процесс *fed-batch* культивирования, в котором клоны оценивались по следующим показателям: динамике жизнеспособности, т. е. проценту жизнеспособных клеток в течение культивирования; динамике плотности жизнеспособных клеток; концентрации антитела в КЖ, достигаемой за определенный период культивирования (уровень волюметрической продукции); по зависимости волюметрической продукции от кумулятивной плотности клеток.

Процесс культивирования контролировали по значениям показателя жизнедеятельности клонов в минибиореакторах. На диаграммах (рис. 3, рис. 4) показаны результаты *fed-batch*-культивирования для клона SS-1, полученные с помощью $ambr^{®}15$. Аналогичные графики изменения рН и DO были получены для каждого клона-продукта.

На графике роста клеточной биомассы (рис. 4) можно наблюдать высокую плотность жизнеспособных

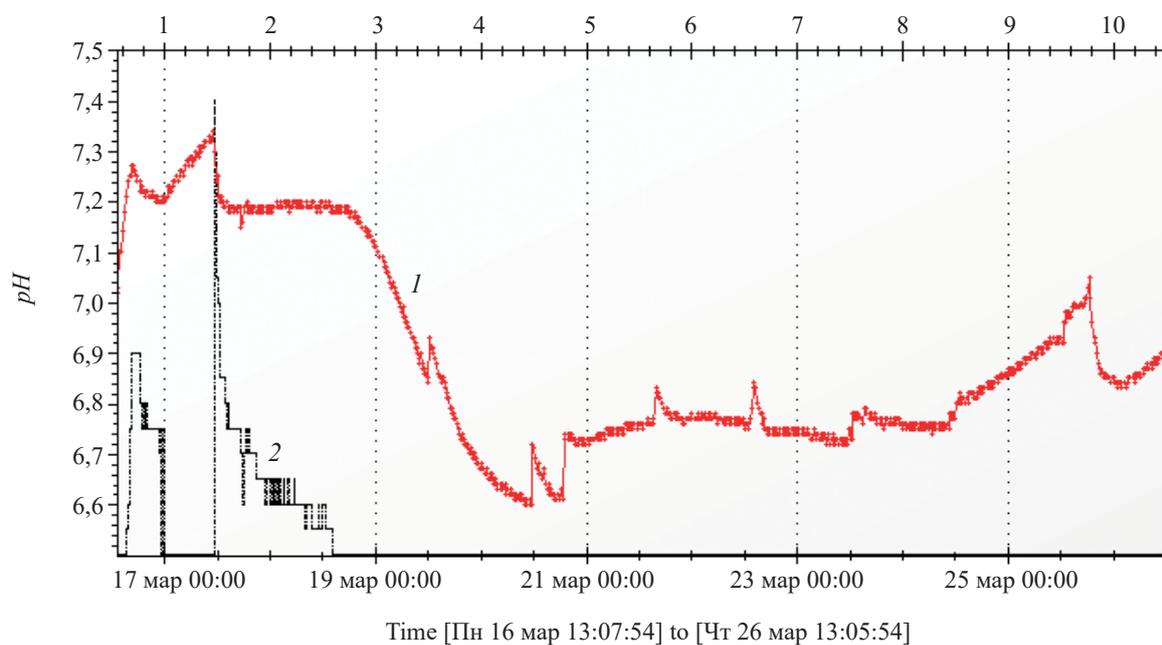
клеток, которая достигает у некоторых клонов до $40 \cdot 10^6$ кл./мл (клон SS-7). Как правило, таких высоких клеточных плотностей можно достичь, используя промышленные биореакторы, которые оснащены барботажными конструкциями. Во время фазы экспоненциального роста клеточной биомассы на 5-й день *fed-batch* культивирования клонов DO снижается до 30% (устанавливается в ручном режиме), и автоматически начинает подаваться кислород в каждый минибиореактор (рис. 3b). Максимальная скорость подачи газа O_2 в минибиореактор системы $ambr^{®}15$ составляет 0,91 мл/мин. Кислород необходим для обменных процессов, и если не будет проходить достаточная аэрация культуры, то клон не достигнет высоких клеточных плотностей и, соответственно, высоких выходов продукта.

Культура во время логарифмической фазы роста активно выделяет CO_2 , что неизменно приводит к закислению культуральной среды, вследствие чего рН среды уменьшается (рис. 3a). Регулирование рН в культуре эукариотических клеток контролируется с использованием газа CO_2 . Подаваемый в минибиореактор CO_2 свободно растворяется в питательной среде и реагирует с водой с образованием угольной кислоты (H_2CO_3), которая находится в равновесии с бикарбонатом (HCO_3^-) и ионами водорода (H^+). Подача CO_2 приведет к снижению рН. Максимальная скорость подачи газа CO_2 в минибиореактор системы $ambr^{®}15$ составляет 1,24 мл/мин. Падение значения рН до 6,6 на графике (см. рис. 3a) в данном случае не критично для целевого продукта, поэтому нижняя граница рН значений в данном эксперименте не регулировалась.

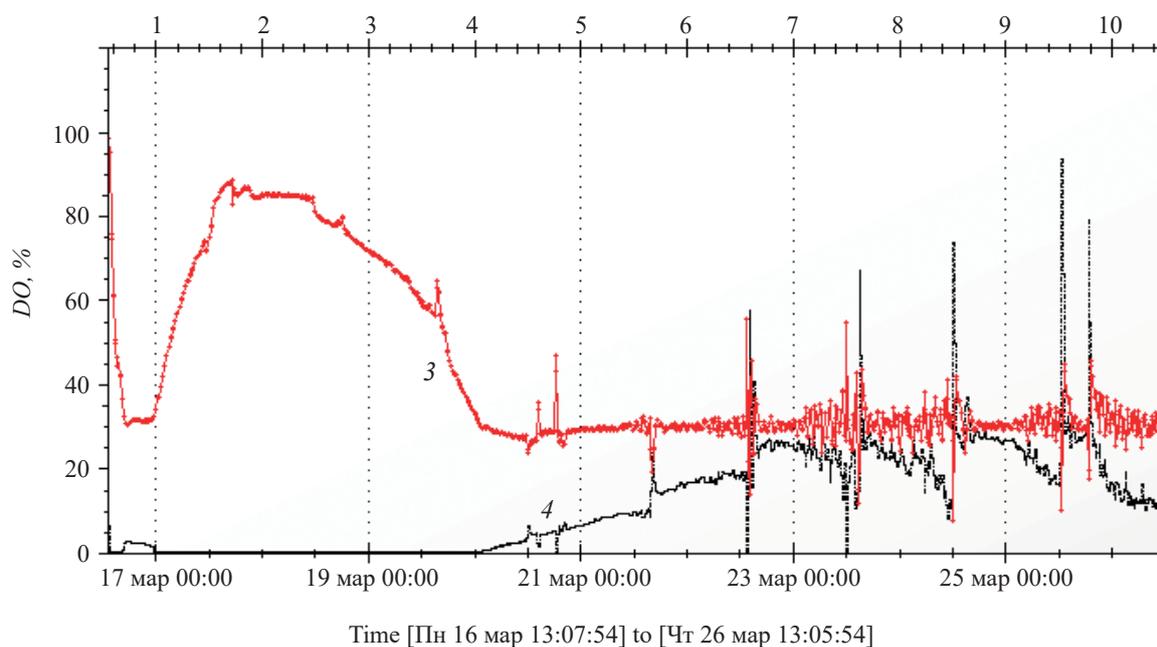
Падение процента жизнеспособных клеток в культуре наблюдали, начиная с 7-го дня культивирования. Лишь у некоторых клонов жизнеспособность оставалась выше 90% на всем протяжении *fed-batch*-процесса: SS-1, SS-2, SS-3, SS-6, SS-9, SS-21, SS-24 (рис. 5).

Продуктивность 24 клонов варьирует в пределах 120–450 мг/л на 9-й день *fed-batch* культивирования (рис. 6), при довольно большом разбросе пиковой клеточной плотности – от 5 до $40 \cdot 10^6$ кл./мл (рис. 4).

Динамика зависимости продуктивности клонов от CCD во время проведения культивирования в режиме *fed-batch* позволяет выявить клоны не просто высоко экспрессирующие, но и способные к достижению высоких клеточных плотностей (рис 7). 24 клона можно условно разделить на несколько групп.



a



b

Рис. 3. График pH (a) и DO (b) для клона SS-1 во время проведения fed-batch-культивирования. 1 – изменение pH среды в течение культивирования; 2 – изменение скорости потока потребляемого углекислого газа; 3 – уровень растворенного кислорода в среде, который поддерживается автоматически на уровне 30%; 4 – изменение скорости потока потребляемого кислорода. Сверху указаны дни культивирования

Fig. 3. pH (a) and DO (b) chart for SS-1 clan during fed-batch cultivation. 1 – the real-time measured pH profile; 2 – flow of carbon dioxide in the mini-bioreactor; 3 – the real-time measured DO profile; 4 – flow of oxygen in the mini-bioreactor. The days of cultivation at the top of the plot

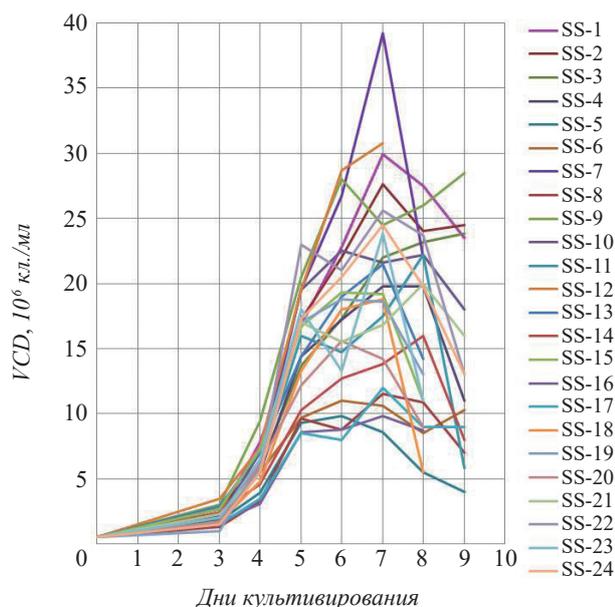


Рис. 4. Клеточная плотность клонов во время проведения эксперимента в режиме fed-batch

Fig. 4. Viable cell density (VCD, 10^6 cells \cdot mL $^{-1}$) in fed-batch process

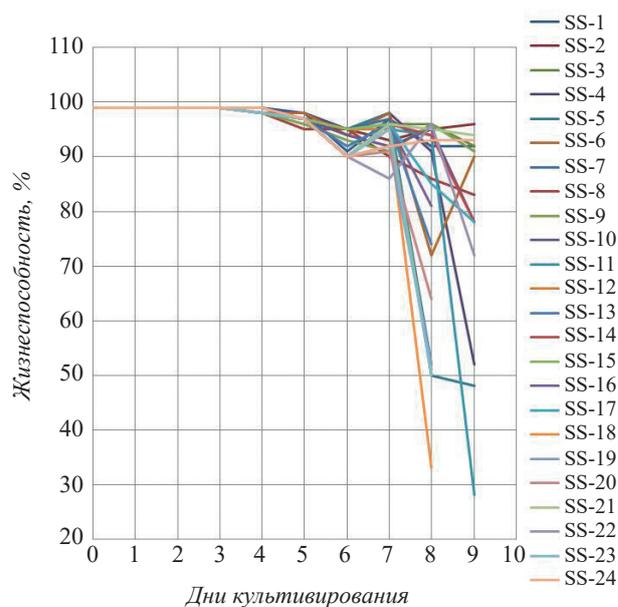


Рис. 5. Жизнеспособность клонов во время проведения эксперимента в режиме fed-batch

Fig. 5. Cell viability in fed-batch process

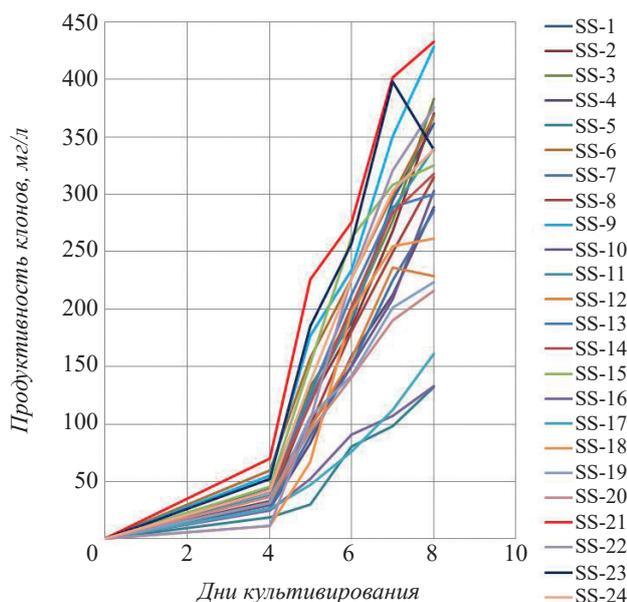


Рис. 6. Продуктивность клонов во время проведения культивирования в режиме fed-batch

Fig. 6. Productivity of clones in fed-batch process

Квадратами отмечены зоны диаграммы, представляющие наибольший интерес для анализа: черный квадрат – наименее продуктивные клоны, несмотря на высокую *CCD* клеток: SS-12, SS-19, SS-7, такие продуценты достигают высоких клеточных плотностей, но при этом экспрессия остается на низком уровне; зеленый квадрат – группа клонов с высокой или средней про-

дукцией при невысокой клеточной плотности, т.е., номинально имеющая высокую специфическую продуктивность, как например SS-6, SS-14. Такие клоны могут оказаться неспособны к достижению высоких клеточных плотностей, но, при условии оптимизации ростовых сред и сохранении уровня специфической продуктивности, дать наиболее высокий титр белка; красный квадрат – клоны достигающие наибольшую волюметрическую продукцию и высокие клеточные плотности. Такие клоны, при условии оптимизации ростовых сред и подкормок имеют хороший потенциал, поскольку, увеличение клеточной плотности приведет к пропорциональному росту волюметрической продуктивности клонов. Примером являются клоны SS-9, SS-3, SS-22, SS-1, SS-21. Данные клоны можно выделить как наиболее перспективные для промышленного использования.

Наибольший прирост продуктивности отметили для клонов SS-9 и SS-21 (рис. 7). Исходя из анализа полученных данных по нескольким параметрам, лидерными клонами были признаны SS-9, SS-3, SS-22, SS-1, SS-21 и в качестве дополнительных – SS-23, SS-24, SS-6, SS-14. Для дальнейших исследований были выбраны восемь лидерных клонов с целью проведения экспериментов по изучению стабильности экспрессии целевого белка, подбору и оптимизации условий культивирования продуцентов и т.д.

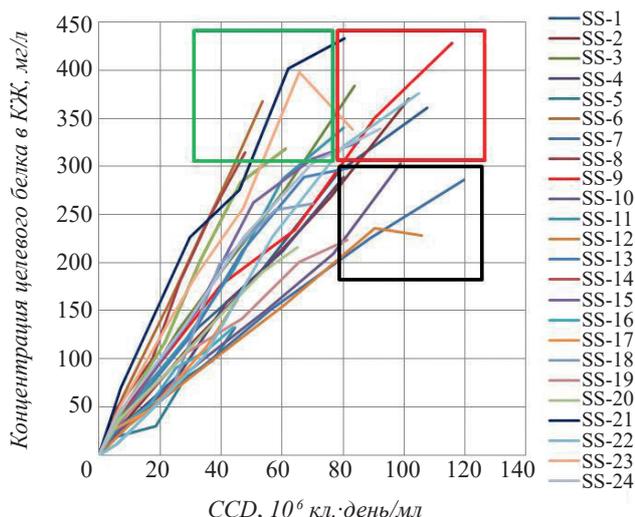


Рис. 7. Зависимость продукции клонов от CCD во время проведения культивирования в режиме fed-batch. Черный квадрат – наименее продуктивные клоны; зеленый квадрат – группа клонов с высокой или средней продукцией при невысокой клеточной плотности; красный квадрат – клоны достигающие наибольшей волюметрической продукции и высокой клеточной плотности

Fig. 7. Volumetric productivity dependence of cumulative cell density in fed-batch process. Black square – the least productive clones; green square – a group of clones with high or medium productivity with low cellular density; red square – clones achieve the highest volumetric production and high cell density

Итак, благодаря использованию системы микробиореакторов удалось автоматизировать и стандартизировать процесс добавления дополнительных компонентов и отбора проб; создать контролируемые условия культивирования (близкие к промышленным) для всей панели анализируемых клонов; исследовать большее количество клонов-производителей за один эксперимент.

Роботизированная система минибиореакторов ambr®15 позволила существенно снизить стоимость процесса масштабирования за счет сокращения последовательных серий масштабирования при выборе лидерного кандидата клонов и благодаря быстрому выявлению клонов, обладающих наиболее оптимальными ростовыми и продуктивными характеристиками для крупномасштабных наработок, что имеет существенное значение при оценке рентабельности получаемых производителей.

ЛИТЕРАТУРА

- Galleguillos S. N., Ruckerbauer D. What can mathematical modelling say about CHO metabolism and protein glycosylation. *Computational Structural Biotechnol. J.*, 2017, 15, 212–221.
- Lim Y., Wong N.S. Engineering mammalian cells in bioprocessing – current achievements and future perspectives. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2010, 55(4), 175–189. doi: 10.1042/BA20090363
- Jayapal K.P., Wlaschin K.F., Hu W., Yap M.G., et al. Recombinant protein therapeutics from CHO cells–20 years and counting. *Chem. Eng. Prog.*, 2007, 103(10), 40.
- Wurm F.M. Gene transfer and gene amplification in recombinant mammalian cells. *Mamm. Cell Biotechnol. Protein. Production*. PMID: 16233356
- Mould D.R. A population pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of single doses of clenoliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 1999, 66(3), 246–257. PMID:10511060. doi: 10.1016/S0009-9236(99)70032-9
- Greig S.L., Brodalumab: First Global Approval, *Drugs*. 2016, 76(14), 1403–1412. doi: 10.1007/s40265-016-0634-8
- Endres C.J., Population pharmacokinetics of brodalumab in healthy adults and adults with psoriasis from single and multiple dose studies. *J. Clin. Pharmacol.*, 2014, 54(11), 1230–1238. doi: 10.1002/jcph.334
- Maselli D.J. Reslizumab in the management of poorly controlled asthma: the data so far. *J. Asthma Allergy*, 2016, 9, 155–162. doi: 10.2147/JAA.S94164
- Hart T.K., Blackburn M.N., Brigham-Burke M. Preclinical efficacy and safety of pascolizumab (SB 240683): a humanized anti-interleukin-4 antibody with therapeutic potential in asthma, *Clin. Exp. Immunol.*, 2002, 130(1), 93–100. doi: 10.1046/j.1365-2249.2002.01973.x.
- Karagiannis S.N., Activity of human monocytes in IgE antibody-dependent surveillance and killing of ovarian tumor cells, *Eur. J. Immunol.*, 2003, 33(4), 1030–1040.
- Velcheti V., Viswanathan A., Govindan R. The proportion of patients with metastatic non-small cell lung cancer potentially eligible for treatment with bevacizumab: a single institutional survey, *J. Thorac. Oncol.*, 2006, 1(5), 501.
- McLaughlin P, Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J. Clin. Oncol.*, 1998, 16(8), 2825–2833.
- Lu D., A fully human recombinant IgG-like bispecific antibody to both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor for enhanced antitumor activity. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280(20), 19665–19672.
- Abdulaziz A., Alsayyari A.A. Pan X. Transcriptome analysis for the scale-down of a CHO cell fed-batch process. *J. Biotechnol.*, 2018, 279, 61–72.

Principle of Express Selection of Leading Producing Clones of Monoclonal Antibodies in the Development of Stable CHO-Based Cell Lines

S.S. TIMONOVA^{1,*}, V.I. PAVELKO¹, I.A. KIRIK¹, V.N. BADE¹, T.O. MALYGINA²,
R.A. KHAMITOV¹, and A.A. PISKUNOV¹

¹*International Biotechnology Center «Generium», Vladimirskaya Oblast, Volginskii settl., 601125 Russia*

²*OPTEC ZEISS Group, Moscow, 109028 Russia*

**e-mail: timonova1993@yandex.ru*

Received February 12, 2019

Revised July 05, 2019

Accepted July 09, 2019

Abstract—Growth and productive characteristics of monoclonal cell lines based on CHO cells and producing a therapeutic protein have been monitored using the robot Ambr Tap Biosystems, which permitted to identify the leading line. Twenty four clones producing a recombinant monoclonal antibody were studied under the close to industrial conditions in a fed-batch culturing mode. The ambr[®]15 cell culture workstation controls 24 disposable mini bioreactors, and offers parallel processing and evaluation of multiple (24) experiments in an automated bench-top system. The volumetric productivity of 24 clones determined by ELISA was 120–450 mg /L. A protocol was shown to select a leader among producing clones for further research.

Key words: producing clones, mini bioreactor; Ambr Tap Biosystems, fed-batch, monoclonal antibodies, CHO cell culture

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-65-72