

Федеральное государственное бюджетное учреждение
"Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра
"Курчатовский институт"
НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика

На правах рукописи

Воронина Екатерина Владимировна

**Разработка технологии получения моноклонального
антитела к фактору некроза опухолей
альфа в целях биофармацевтического производства**

03.01.03 – молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н., Серёгин Ю. А.

Москва – 2018

Содержание

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ	10
1.1. Актуальность проблемы	10
1.2. Цель и задача исследований	12
1.3. Научная новизна	13
1.4. Практическая значимость и внедрение результатов научных исследований в производство	13
1.5. Личный вклад соискателя	13
1.6. Апробация результатов работы	14
1.7. Публикации	15
1.8. Объем и структура и диссертации	15
1.9. Положения, выносимые на защиту	15
II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
2.1 Роль фактора некроза опухоли альфа	17
2.2 Моноклональные антитела к ФНО-альфа в лечении ревматоидного артрита и других заболеваний	26
2.3 Современные тенденции в разработке технологий получения биофармацевтических препаратов	35
2.4 Этапы создания стабильной клеточной линии для экспрессии моноклональных антител	42
2.5 Основные аспекты оптимизации технологии культивирования	50
2.5.1 Температура культивирования	51
2.5.2 Величина pH	52
2.5.3 Концентрация растворенного кислорода	53
2.5.4 Осмолярность среды	55
2.5.5 Концентрация растворенного углекислого газа	56
2.5.6 Основные питательные вещества и метаболиты	57
2.5.7 Добавки, влияющие на продуктивность	60
2.5.8 Добавки, влияющие на гликозилирование	65
2.6 Режимы и аппаратное оформление процессов культивирования клеток СНО для производства мАТ	69
III. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	79
3.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	79
3.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	99
3.2.1. Создание клеточной линии, стабильно продуцирующей моноклональное антитело адалимумаб	99
3.2.1.1. Дизайн экспрессионных конструкций	99
3.2.1.2. Отбор индивидуальных минипулов методом предельных разведений с последующей амплификацией и субклонированием	105
3.2.1.3. Отбор индивидуальных клонов методом предельных разведений общего амплифицированного пула	111
3.2.1.4. Выбор клона с максимальной продуктивностью	119

3.2.2. Оптимизация технологии культивирования клеточной линии CHO-производителя мАТ Адалимумаб к фактору некроза опухолей альфа	127
3.2.2.1. Подбор питательной среды и подпитки, оптимальных для культивирования клонов-производителей	127
3.2.2.2. Определение качественных характеристик мАТ адалимумаб, моделируемых на этапах культивирования	132
3.2.2.3. Исследование профиля гликозилирования биосимилярного и оригинального мАТ адалимумаб	133
3.2.2.4. Оценка значимости различий в профиле гликозилирования биосимилярного и оригинального мАТ адалимумаб	136
3.2.2.5. Оптимизация профиля гликозилирования моноклонального антитела адалимумаб	138
3.2.3 Масштабирование технологии культивирования клеточной линии CHO-DHFR-ADMB26 для производства моноклонального антитела адалимумаб	151
3.2.3.1 Подготовка инокулята	151
3.2.3.2 Сравнение эффективности культивирования в условиях механического и волнового перемешивания	153
3.2.3.3 Выбор температурного режима	155
3.2.3.4 Фильтрация и осветление культуральной жидкости, содержащей моноклональное антитело адалимумаб	158
3.2.4 Оценка биоподобия мАТ адалимумаб	161
3.2.4.1 Анализ профиля гликозилирования мАТ адалимумаб при культивировании в выбранных условиях	161
3.2.4.2 Оценка биологической активности биоподобного мАТ адалимумаб в сравнении с оригинальным	162
3.2.4.3 Оценка заряженных изоформ биосимилярного мАТ адалимумаб в сравнении с оригинальным	163
3.2.5 Технологическая схема процесса и материальный баланс	170
3.2.6 Экономическая эффективность процесса	174
IV. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	176
V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	187
5.1 Выводы	187
5.2 Практическое использование научных результатов	189
5.3 Рекомендации по использованию научных выводов	190
VI. ЛИТЕРАТУРА	191

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

USFDA (*англ. US Food & Drug Administration*) – управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США

EMA (*англ. European Medicines Agency*) – европейское агентство лекарственных средств

мАТ – моноклональные антитела

БПВП – базисные противовоспалительные препараты

ФНО-альфа – фактор некроза опухолей альфа

РА – ревматоидный артрит

ADAM17 (*англ. a disintegrin and metalloproteinase domain 17; tumor necrosis factor alpha converting enzyme; TACE; CD156b*) – специфический ФНО-альфа конвертирующий фермент

TNFR1 и **TNFR2** (*англ. tumor necrosis factor receptor superfamily*) – специфические мембранные рецепторы к ФНО-альфа: типа I или CD120a, TNFRSF1A и типа II или CD120b, TNFRSF1B, соответственно

NF-κB (*англ. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) – универсальный фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла

ERK (*англ. extracellular signal-regulated kinase*) – внеклеточная регулируемая киназа

p38, p38MAPK (*англ. mitogen-activated protein kinase*) – митоген-активируемая протеинкиназа

JNK – c-Jun N-концевая киназа

TRADD – TNFR-ассоциированный белок домена смерти. Белок TRADD опосредует передачу сигнала от активированных рецепторов ФНО к белкам **FADD** (*англ. Fas-associated DD-protein*) и **RIP** (*англ. receptor interacting protein*).

TRAF2 – TNFR-ассоциированный белок, необходимый для опосредованной TNF-альфа-активации MAPK8 / JNK и NF-κB.

FADD – Fas-ассоциированный белок с доменом смерти

Bax – проапоптотический белок

IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, IL-18 – молекулы семейства интерлейкинов

iNOS – синтазы оксида азота, NO-синтазы, группа ферментов, катализирующих образование оксида азота и цитруллина из аргинина, кислорода и никотинамидадениндинуклеотидфосфат

COX-2 (*англ. cyclooxygenase, COX*) – циклооксигеназа-2

5-LOX (*англ. Arachidonate 5-lipoxygenase*) – 5-липоксигеназа

AP-1 (*англ. activator protein*)– транскрипционный фактор, активатор протеина-1

MEKK1 (*англ. mitogen-activated protein kinase, MAP3K1*)– MAP/ERK киназа 1.

MKK7 – MAP-киназа 7

DD (*англ. death domain*) – домен смерти

MAPKs – группа мультифункциональных внутриклеточных сигнальных путей, содержащих одну из митоген-активируемых протеинкиназ и контролирующих транскрипцию генов, метаболизм, пролиферацию и подвижность клеток, апоптоз и другие процессы

Caspase-8 – цистеиновая протеаза, расщепляющая белки исключительно после аспартата и играет важную роль в процессах апоптоза, некроза и воспалительных процессах

MLKL – псевдокиназа, играющая главную роль в некроптозе

АКТ – семейство протеинкиназ В человека, которые присоединяют к разнообразным цитозольным белкам остатки фосфорной кислоты, регулируя таким образом их активность, и играют важную роль в регуляции клеточного цикла, апоптоза, метаболизма глюкозы, ангиогенезе

GM-CSF (*англ. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, ГМ-КСФ. Полипептидный цитокин, относится к группе гранулоцитарно-макрофагальных колониестимулирующих факторов вместе с интерлейкином 3 и интерлейкином 5

VEGF (*англ. vascular endothelial growth factor*) – фактор роста эндотелия сосудов, сигнальный белок, вырабатываемый клетками для стимулирования васкулогенеза (образование эмбриональной сосудистой системы) и ангиогенеза (рост новых сосудов в уже существующей сосудистой системе)

MCP-1 (*англ. monocyte chemoattractant protein 1*) – хемотаксический для макрофагов белок 1 цитокин, относится к группе СС-хемокинов (β -хемокинов). Является наиболее мощным фактором хемотаксиса моноцитов в организме, осуществляет контроль за эгрессом клеток из кроветворных органов, их трафиком к фокусам воспаления

RANTES (*англ. regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*) – хемокин, выделяемый Т-клетками при активации, хемоаттрактант для моноцитов и Т-клеток фенотипа CD4 /CD45RO

ICAM-1 (*англ. inter-cellular adhesion molecule 1, также CD54*) – молекула клеточной адгезии, присутствующая в низкой концентрации на мембранах лейкоцитов и эндотелиальных клеток

VCAM-1 (*англ. CD106, vascular cell adhesion molecule 1*) – белок, входящий в суперсемейство иммуноглобулинов, играющий значительную роль в иммунной системе человека

CRP – С-реактивный белок.

MMP – матриксные металлопротеиназы семейство внеклеточных цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса

RANKL или **TNFSF11** (*англ. tumor necrosis factor ligand superfamily member 11; receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) – мембранный белок, цитокин семейства факторов некроза опухоли

OPG – остеопротегерин фактор ингибирования остеокластогенеза

COX – циклооксигеназы, группа ферментов, участвующие в синтезе простаноидов, таких как простагландины, простациклины и тромбоксаны

PGE2 – простагландин E2, основной простагландин, высвобождаемый эндотелиальными клетками

SOD – супероксиддисмутаза, фермент антиоксидантной защиты, катализирующий дисмутацию синглетного кислорода, образующегося при прохождении электронов по дыхательной цепи

ЦНС – центральная нервная система

ЖНВЛП – жизненно необходимые и важнейшие лекарственные препараты

SUS (*англ. single-use systems*) – системы одноразового применения

USP (*англ. up-stream*) – стадии культивирования

DSP (*англ. down-stream*) – стадии выделения и очистки

NS0 – клетки мышины миеомы

PER.C6 – клетки сетчатки глаза человека

HEK-293 – клетки почки эмбриона человека

CHO – клетки яичников китайского хомячка

DHFR – дегидрофолатредуктаза

GS – глутаминсинтетаза

MSX – метионинсульфоксимин

MTX – метотрексат

GOI – ген интереса

TALEN (*англ. Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) – система редактирования геномов

CRISPR/Cas9 (*англ. Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats*) – система редактирования геномов

CMV, hCMV, mCMV – цитомегаловирус, человека, мыши

CaMV 35S (*англ. cauliflower mosaic virus*) – конститутивно-активный промотор из вируса мозаики цветной капусты.

RSV (*англ. respiratory syncytial virus*) – респираторно-синцитиальный вирус человека

EF-1 α – фактор элонгации

UbC – убиквитин

MAR (*англ. matrix attachment region*) – область, ассоциированная с матрицей

ИФА – иммуно-ферментный анализ

DO – растворенный кислород

AK – аминокислоты

HDAC – гистондеацетилаза

DMCO – диметилсульфоксид

ADCC (*англ. antibody-dependent cellular cytotoxicity*) – антитело-зависимая клеточная цитотоксичность

CDC (*англ. complement-dependent cytotoxicity*) – комплемент-зависимая цитотоксичность.

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

eGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок

BpA (*англ. Bovine Growth Hormone Polyadenylation Signal*) – сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста

Sv40 (*англ. Simian virus 40*) – 40 ранний промотор вируса Simian virus 40, представляющий последовательность нуклеиновой кислоты, происходящей от генома вакуолизирующего обезьяньего вируса

NPT (*англ. neomycin phosphotransferase*) – ген фермента, который детоксифицирует антибиотик неомицин и широко используется в качестве селективного доминантного маркера при трансгенозе и трансфекции, обеспечивая устойчивость клеток к неомицину

IRES (*англ. Internal Ribosome Entry Site*) – участок внутренней посадки рибосомы из вируса энцефаломиокардита EMCV

IRESwt (*англ. Internal Ribosome Entry Site wild tipe*) – участок внутренней посадки

IRESatt (*англ. Internal Ribosome Entry Site with attenuated translation efficiency*) – участок внутренней посадки

ИСП – испытуемый образец

СТД – стандартный образец

КЖ – культуральная жидкость

ИОХ – ион-обменная хроматография

ИЭФ – изoeлектрическое фокусирование

EC50 – полумаксимальная эффективная концентрация, означает концентрацию лиганда, которая вызывает эффект, равный половине максимального возможного для данного лиганда после истечения некоторого промежутка времени

GMP – (*англ. Good Manufacturing Practice*) – надлежащая производственная практика

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность проблемы

Генно-инженерные биологические препараты, созданные на основе моноклональных антител, – одно из передовых направлений фармакотерапии в клинической практике нынешнего времени. Использование моноклональных антител в качестве терапевтических агентов явилось для медицины стратегическим этапом в смене концепции лечения – от неспецифической к специфической (таргетной) терапии [1].

Самым перспективным подходом в этой области на сегодняшний день является применение нового поколения полностью гуманизированных генно-инженерных моноклональных антител, которые обладают высокой эффективностью и безопасностью. Благодаря прогрессу в молекулярной биологии и биотехнологии, полностью гуманизированные антитела быстро захватили рынок. В настоящее время в мире организациями FDA и EMEA одобрено более 40 лекарственных препаратов на основе моноклональных антител, из которых 5 имеют мышинное происхождение, 2 представлены биспецифическими конструкциями, 8 – химерными, 18 – гуманизированными и 13 являются полностью гуманизированными антителами [2-4].

Учитывая, что терапевтические моноклональные антитела получили большое распространение в современной медицине, они применяются для лечения аутоиммунных, онкологических заболеваний, и для некоторых из них являются единственной эффективной терапией. На сегодня одной из наиболее важных мишеней моноклональных антител является фактор некроза опухоли альфа (ФНО-альфа), которому придают особое значение в иммунопатогенезе ревматоидного артрита. Следует отметить, что терапевтические моноклональные антитела к ФНО-альфа постоянно фигурируют в списках самых продаваемых биофармацевтических препаратов в мире. Так, по результатам исследований компании «Evaluate Pharma»,

лидером из десяти наиболее продаваемых лекарственных средств за последние годы является Хумира (моноклональное антитело адалимумаб) компании Abbott с объемом продаж на мировом рынке на 2016 год на уровне 15,7 миллиардов долларов. Показано, что адалимумаб является высокоэффективным биологическим препаратом из группы ингибиторов ФНО-альфа. Причина его популярности заключается не только в его широком спектре применения против воспалительных заболеваний разной природы, таких как ревматоидный артрит [5], псориаз [6], болезнь Крона [7] и др. Важно отметить, что в 2016 году адалимумаб получил свое десятое назначение, на этот раз для лечения неинфекционных увеитов [8]. Подтверждено, что этот препарат имеет ряд преимуществ перед аналогами своей группы [9], во-первых, благодаря сниженной иммуногенности, обусловленной полностью гуманизированной структурой антитела. Во-вторых, это единственное лекарственное средство биологического происхождения, подходящее для самостоятельного применения больными в амбулаторных условиях. Кроме того, для адалимумаба характерна стабильность эффекта при многолетнем применении, что было показано в длительном рандомизированном клиническом исследовании [9].

Истечение срока патентной защиты оригинальных биопрепаратов открыло возможность развитию рынка их аналогов или биосимиляров. Среди основных факторов повышения заинтересованности к их созданию указывают умеренную цену по сравнению с оригинальными продуктами, широкую сферу применения, а также возможность увеличения эффективности. Очевидно, что применение менее дорогих, при этом безопасных и эффективных вариантов лечения позволяет системам здравоохранения повысить доступность биопрепаратов для большего числа пациентов, сэкономить средства для последующего инвестирования в новые области и, таким образом, снизить нагрузку на бюджет.

С учетом вышесказанного разработка технологии получения отечественного биоаналога полностью гуманизированного высокоэффективного моноклонального

антитела адалимумаб в рамках снижения импортозависимости позволит уменьшить стоимость терапии и финансовую нагрузку на систему здравоохранения.

1.2. Цель и задача исследований

Целью данного исследования является разработка опытно-промышленной технологии получения – биоаналога моноклонального антитела адалимумаб.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи.

1. Создать клеточную линию, стабильно экспрессирующую мАТ адалимумаб.
2. Установить характеристики качества мАТ адалимумаб, определяемые и моделируемые на этапе культивирования.
3. Осуществить скрининг сред и подпиток в рамках оптимизации условий культивирования в малом объеме для достижения максимальной продуктивности и оценить соответствия качества продукта установленным характеристикам.
4. Оценить значимость различий качественных характеристик биоподобного и оригинального мАТ адалимумаб в рамках его изменчивости.
5. Осуществить масштабирование разработанной технологии в биореакторах разных типов и выбрать условия, которые обеспечивают стабильное промышленное производство мАТ адалимумаб надлежащего качества с полноценными иммунобиологическими свойствами в объемах, требуемых в роли жизненно необходимого лекарственного средства.
6. Провести три установочные серии культивирования в оптимизированных условиях для подтверждения стабильности и воспроизводимости процесса.
7. Подтвердить биоподобие мАТ адалимумаб, получаемого по разработанной технологии, в сравнении с оригинальным.
8. Оценить экономическую эффективность разработанной технологии.

1.3. Научная новизна

1. Создана стабильная клеточная линия на основе СНО, продуцирующая мАТ адалимумаб, и депонирована во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика».
2. Впервые проведено сравнение эффективности технологии культивирования суспензионных клеток СНО и качества производимого моноклонального антитела в трех типах биореакторов (с механической мешалкой, волновом и орбитальном).
3. Разработаны оригинальные подходы для оптимизации профиля гликозилирования полученного моноклонального антитела. Впервые проведена оценка эффективности связывания антитела с рецептором FcγRIIIA (CD16a) в зависимости от содержания маннозного гликана.

1.4. Практическая значимость и внедрение результатов научных исследований в производство

Выполненные научные исследования и результаты, полученные в настоящей работе, могут быть учтены и использованы в качестве востребованных решений практических задач на этапах разработки технологий производства современных высокоэффективных лекарственных препаратов.

Разработанная технология будет применена для организации производства моноклонального антитела адалимумаб на площадке ООО «Фармапарк», относящегося к классу жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств, используемого для лечения аутоиммунных заболеваний, в первую очередь ревматоидного артрита.

1.5. Личный вклад соискателя

Вклад соискателя состоит в получении, обработке и интерпретации экспериментальных данных, подведении итогов работы, подготовке публикаций. Стабильная клеточная линия, экспрессирующая

моноклональное антитело адалимумаб, получена в ходе совместных исследований автора и группы сотрудников Департамента экспериментального производства ООО «Фармапарк». Автором обоснована возможность использования двух стратегий отбора клонов-продуцентов для получения стабильной клеточной линии, проведена работа по исследованию стабильности полученной клеточной линии, создан мастер-банк продуцента, проведены его паспортизация и депонирование, выполнены эксперименты по оптимизации условий и параметров культивирования, изучению влияния подпиток, добавок, типа биореактора на качество и количество целевого продукта, а также по масштабированию процесса. Работы по очистке и выделению моноклонального антитела адалимумаб из культуральной жидкости, а так же разработка аналитических методик проводились совместно с сотрудниками Департамента экспериментального производства ООО «Фармапарк».

1.6. Апробация результатов работы

Результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на XV Международной научной конференции «High-Tech in Chemical Engineering (Москва, 2014), на VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015), на втором форуме CellCulture&BioProcessing (Берлин, 2015), на VI Всероссийской молодежной научно-технической конференции и школе молодых ученых (Москва, 2015), на IX Международной научно-практической конференции «Биотехнология в комплексном развитии регионов» (Москва, 2016), на Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2017), на заседании секции «Молекулярная биология» Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра "Курчатовский институт" 10 апреля 2018 года (Москва).

1.7. Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 9 научных работ, из которых две статьи в изданиях, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий (перечень ВАК), статья в зарубежном журнале, индексируемом в Web of Science и Scopus, и шесть публикаций, цитируемых в базе РИНЦ.

1.8. Объем и структура и диссертации

Диссертационная работа изложена на 222 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов, выводы, сведения о практическом использовании результатов, рекомендации по использованию научных выводов. Список использованной литературы включает 262 источника, из них 223 зарубежных авторов. Материалы диссертации содержат 21 таблицу, 55 рисунков.

1.9. Положения, выносимые на защиту

1. Амплификация общего пула трансфецированных клеток с последующим отбором клонов методом предельных разведений на платформе CHO-DG44 является эффективным и быстрым подходом на этапе разработки клона-продуцента
2. Культивирование в реакторе волнового типа с применением двухфазного температурного режима позволяет повысить эффективность процесса.
3. Одной из важных характеристик моноклонального антитела, коррективку которой требуется осуществить на этапе разработки технологии культивирования, является профиль гликозилирования, определяющий как эффекторные функции молекулы, так и ее фармакокинетику.

4. Внесение сахарозы в конечной концентрации 60 мМ при культивировании с периодическим добавлением подпитки позволяет эффективно повысить долю гликана Man 5

5. Разработанная технология получения биоаналога моноклонального антитела Адалimumаб позволяет осуществлять стабильное промышленное производство надлежащего качества с полноценными иммунобиологическими свойствами, обеспечивая его безопасное и эффективное применение в объемах, требуемых в роли жизненно необходимого лекарственного средства.

II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Роль фактора некроза опухоли альфа

Фактор некроза опухоли альфа (ФНО-альфа, ранее известный как кахектин) был отмечен как феномен в момент его открытия и до сих пор сохраняет свои позиции в качестве одной из наиболее интенсивно исследуемых молекул в области биомедицины [10-13].

Первоначально ФНО-альфа идентифицировали как фактор, способный вызывать *in vivo* геморрагический некроз некоторых опухолевых клеток в условиях введения токсина на основе бактерий *Streptococcus pyogenes* и *Serratia marcescens*, разработанного ранее Уильямом Коли после установления взаимосвязи между перенесёнными инфекциями, вызванными указанными выше бактериями, и регрессией раковых опухолей у пациентов [10, 14].

Интенсивные междисциплинарные исследования биологических функций и терапевтического применения ФНО-альфа привели к пониманию тонкостей его функциональной множественности. Однако, до сих пор остается ряд нерешенных вопросов о его роли в организме человека, что представляет собой одно из важных ограничений для его безопасного терапевтического использования в качестве мишени для лечения разного рода патологий [15-21].

ФНО-альфа рассматривается как прототип семейства молекул, с одной стороны, играющих важную роль в регуляции нормальной дифференцировки, роста и метаболизма различных клеток, а с другой – выступающих в роли медиаторов патологических иммуновоспалительных процессов при различных заболеваниях человека [13].

В первую очередь, ФНО-альфа является важным цитокином в механизме врожденного иммунитета и экспрессируется в качестве трансмембранного белка с молекулярной массой 26 Кда (233 аминокислоты) [11, 22-25]. Под действием специфического ФНО-конвертирующего

фермента ADAM17 (известный так же как TACE) мембраносвязывающий фрагмент отщепляется и образуется растворимый ФНО-альфа с молекулярной массой 17 кДа (157 аминокислот) [22].

В результате связывания ФНО-альфа со специфическими мембранными рецепторами массой 55 кДа (типа I, или CD120a, TNFRSF1A, TNFR1) и 75 кДа (типа II, или CD120b, TNFRSF1B, TNFR2) на молекулярном уровне происходят строго регулируемые сигнальные каскады с участием внутриклеточных комплексов I, IIa, IIb, IIc (рис. 1 [11]),

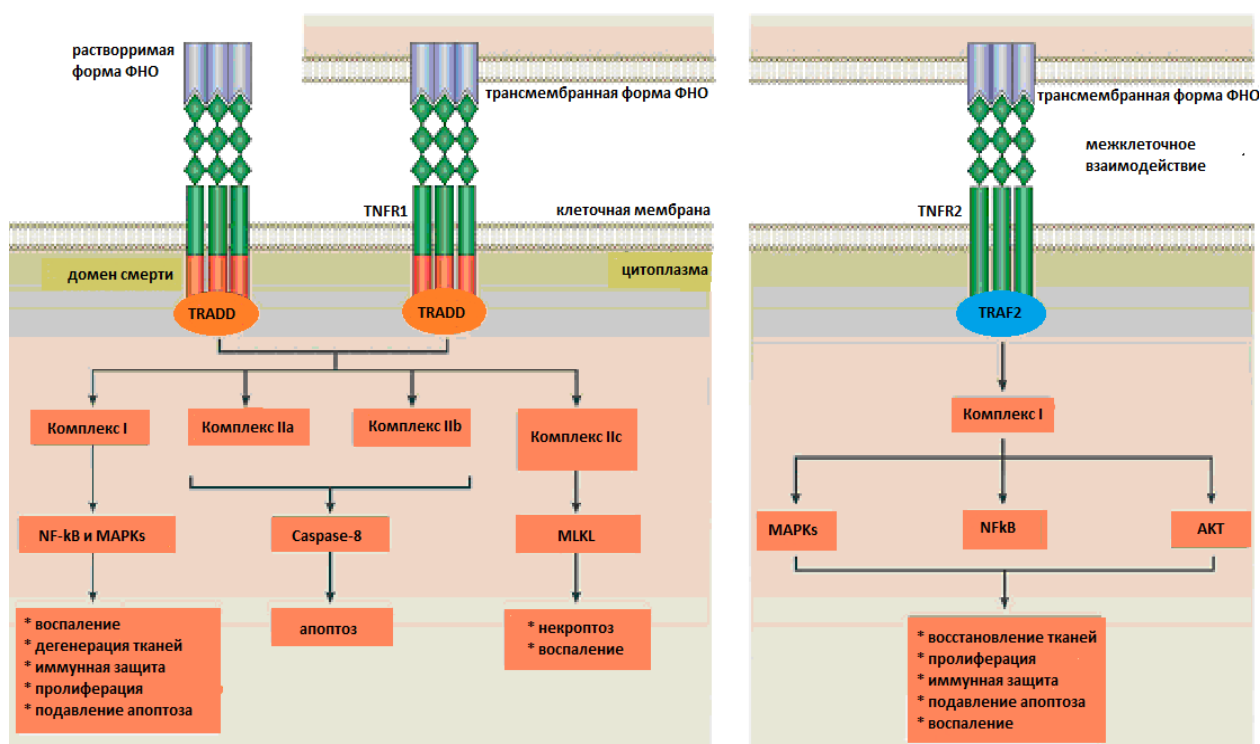


Рисунок 1 – Механизмы активации рецепторов TNFR1 и TNFR2

что приводит к активации факторов транскрипции, которые, в свою очередь, регулируют активность нескольких генов, кодирующих синтез провоспалительных цитокинов и других медиаторов воспаления, а также вызывают программируемую гибель клеток [23-25]. Известно, что ФНО-альфа индуцирует как минимум 5 различных типов сигналов, включающих в себя активацию NF-κB, активацию путей апоптоза, выделение внеклеточной регулируемой киназы (ERK), p38 митоген-активируемой протеинкиназы (p38MAPK) и c-Jun N-концевой киназы (JNK). Когда ФНО-альфа связывается с TNFR1 на поверхности клетки-мишени, он мобилизует TNFR-

ассоциированный белок домена смерти (TRADD) [26]. В дальнейшем сигнал передается на Fas-ассоциированный белок с доменом смерти (FADD), который последовательно активирует каспазу-8 и каспазу-3 и вызывает апоптоз [27]. Также ФНО-альфа может активировать митохондрии путем последовательного выделения активных форм кислорода, цитохрома C и проапоптотического белка Вах, что приводит к активации каспазы-9 и каспазы-3 и так же к апоптозу клетки [28]. Кроме того, ФНО-альфа активирует NF- κ B, который, в свою очередь, регулирует экспрессию белков, ассоциированных с жизнеспособностью клеток и клеточной пролиферацией [29]. Провоспалительные эффекты ФНО-альфа обеспечиваются за счет NF- κ B регулируемых белков, таких как интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-8 (IL-8), интерлейкин-18 (IL-18), хемокины, индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), циклооксигеназы-2 (COX-2) и 5-липоксигеназы (5-LOX) – всех основных медиаторов воспаления. Более того, ФНО-альфа может индуцировать экспрессию самого себя через активацию NF- κ B [30]. ФНО-альфа также может запускать пролиферацию клеток через фактор транскрипции – активатора протеина-1 (AP-1) [31], который инициируется ФНО-альфа путем последовательной мобилизации TNFR1, TRADD, TRAF2, MAP/ ERK киназы 1 (MEKK1), MAP-киназы 7 (MKK7) и JNK. Поскольку TNFR2 может непосредственно связываться с TRAF2, он может активировать как NF- κ B, так и MAPK-сигнализацию. А также недавно было показано, что TRADD является посредником в клеточной сигнализации Toll-подобных рецепторов 3 и 4 [32].

Следует отметить, что экспрессия различных рецепторов семейства ФНО может значительно отличаться между типами клеток и тканей [22]. Наиболее широко представлены рецепторы, содержащие в своей структуре внутриклеточный домен смерти DD (домен смерти) [19-25, 33]. Рецептор TNFR1, который содержит DD, разнороден и экспрессируется на всех изученных типах клеток организма, что, в зависимости от этого, предполагает огромное разнообразие его функций в организме человека. В

противоположность этому показано, что экспрессия TNFR2 ограничена клетками иммунной системы, эндотелиальными и нервными клетками [6, 23].

В естественных условиях ФНО-альфа вырабатывается многими типами клеток: активированными макрофагами, В-лимфоцитами, Т-лимфоцитами, естественными киллерными клетками, полиморфноядерными лейкоцитами, тучными клетками и базофилами, фибробластами, клетками эндотелия сосудов и др. [11, 34] и является важнейшим плеiotропным цитокином, регулирующим множество аспектов развития, функционирования и поддержания иммунной системы.

Одну из важных ролей ФНО-альфа в организме человека отводят его участию в защите организма от бактериальных, вирусных и паразитарных инфекций, а также вместе с интерлейкином-1 и интерлейкином-6 обуславливает болевой синдром (способствует гиперноцицепции) при воспалительных процессах [11]. Однако, значительное повышение уровня экспрессии ФНО-альфа в очаге воспаления, а в ряде случаев и во всем организме, приводит к развитию аутоиммунных заболеваний. Такие разные заболевания, как ревматоидный артрит (РА), анкилозирующий спондилит, псориаз, воспалительные заболевания кишечника язвенный колит и болезнь Крона, казалось бы, совсем непохожи друг на друга своими проявлениями [11, 12, 19, 36]. Однако, изучение этиологии данных состояний, позволяют говорить об имеющихся сходствах в патогенетических механизмах их развития, главную роль в которых играет ФНО-альфа (рис. 2) [36].

Ревматоидный артрит – наиболее частое аутоиммунное заболевание, распространенность которого в популяции достигает 1,0%, а экономические потери для общества сопоставимы с ишемической болезнью сердца. Хотя в конце XX века в его лечении достигнут существенный прогресс, фармакотерапия этого заболевания по-прежнему остается одной из наиболее сложных проблем клинической медицины [37]. При РА наиболее часто поражаются суставы кистей рук – межфаланговые и пястно-фаланговые (рис. 3) [38].

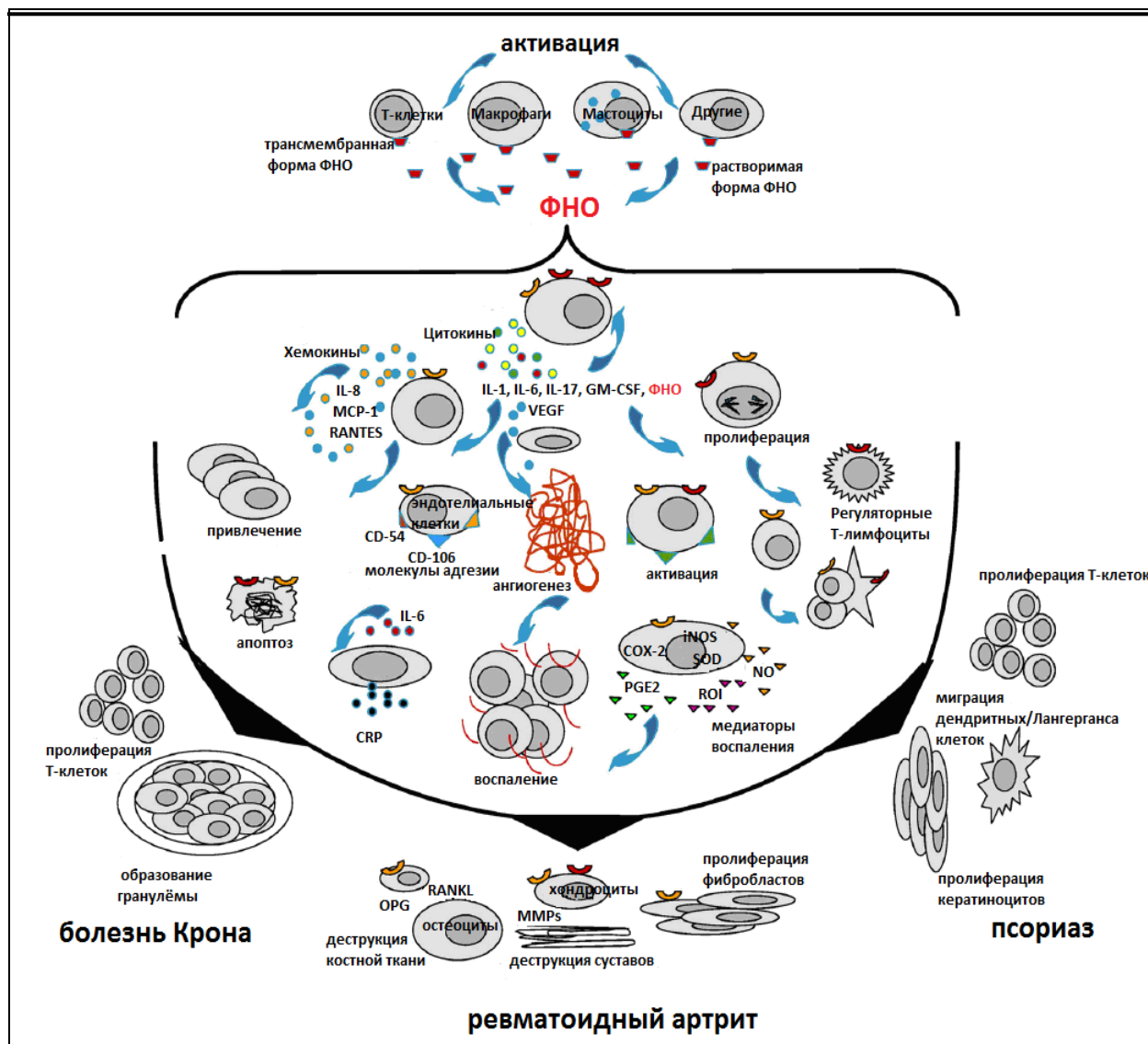


Рисунок 2 – Хронизация иммунопатологических процессов, вызванная неконтролируемой гиперпродукцией ФНО-альфа – каскад механизмов, опосредованных ФНО, в патогенезе ревматоидного артрита, болезни Крона и псориаза)

В условиях развития РА клетки иммунной системы мигрируют в суставную сумку (рис. 3) [37, 38], вызывая ее воспаление, или синовит. Для того чтобы началась «оккупация» (инфильтрация) сустава иммунными клетками, в синовиальной оболочке должны произойти функциональные изменения. Эндотелий сосудов начинает производить молекулы адгезии, необходимые для закрепления проплывающих мимо лейкоцитов и их проникновения из сосудистого русла в ткань. Кроме того, происходит

разрастание сосудистой системы (неоангиогенез), что также помогает усиленной инфильтрации сустава иммунными клетками.

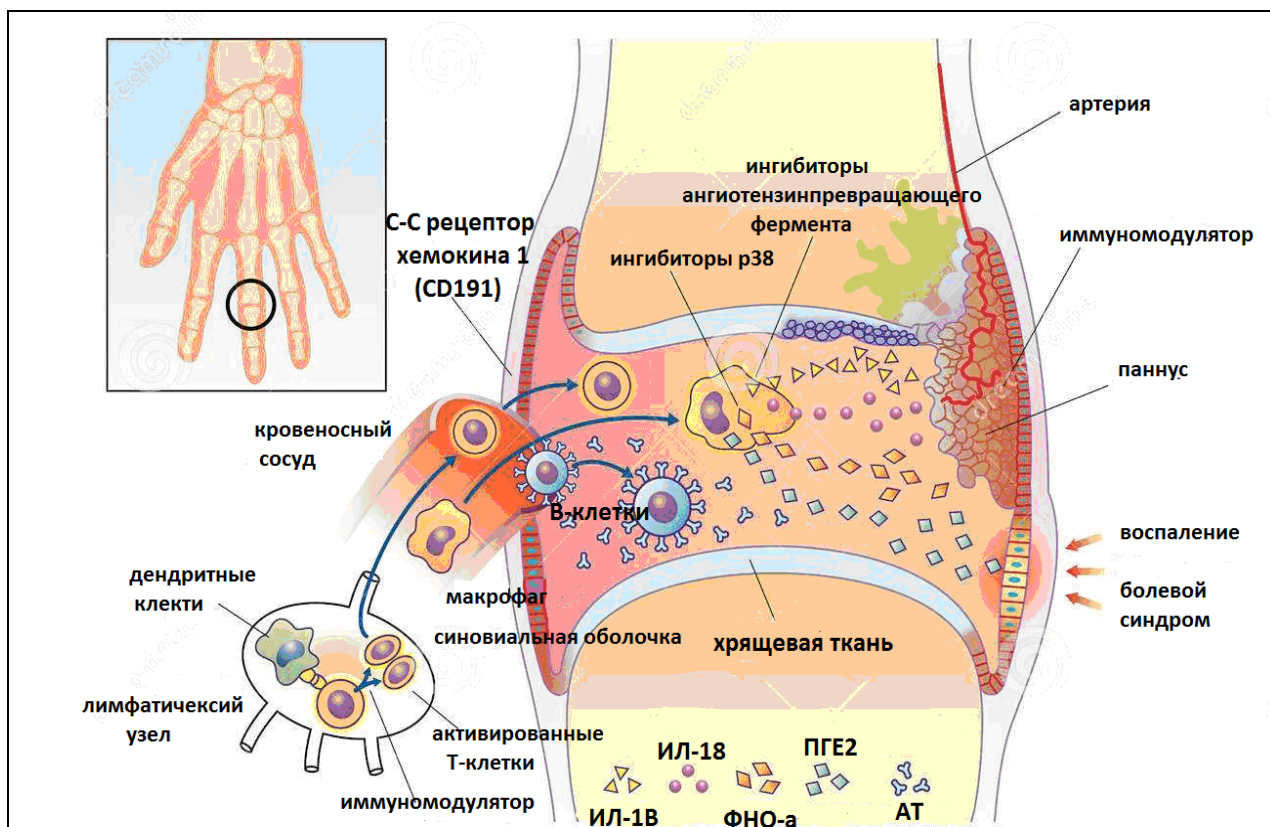


Рисунок 3 – Хронизация иммунопатологических процессов, вызванная неконтролируемой гиперпродукцией ФНО-альфа в суставной сумке

Наряду с этим, активируются и фибробласты синовиальной сумки. Они становятся подвижными, теряют способность останавливать свое деление при контакте с другими клетками, так называемое контактное ингибирование, и избегают клеточной гибели (апоптоза). Это происходит из-за мутаций в генах опухолевых супрессоров. Кроме того, фибробласты начинают производить большие количества матриксных металлопротеиназ и провоспалительных цитокинов, привлекающих иммунные клетки. Матриксные металлопротеиназы, как специальные ферменты, способны расщеплять белковые компоненты внеклеточного матрикса. Они разрушают коллагеновые сети, составляющие основу хряща. Тканевых ингибиторов металлопротеиназ, тоже вырабатываемых фибробластами, оказывается недостаточно для остановки лавинообразного процесса разрушения сустава. Иммунные клетки, привлекаемые цитокинами, инфильтрируют

синовиальную оболочку сустава. В таком иммунном инфильтрате присутствуют Т- и В-лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы, тучные клетки и другие клетки врожденного иммунитета. В свою очередь, макрофаги отмечают как основные продуценты провоспалительных цитокинов, ответственных за развитие синовита. Кроме того, они синтезируют активные формы кислорода и азота, а также ферменты, разрушающие межклеточный матрикс. Этим же занимаются и другие клетки врожденного иммунитета, присутствующие в воспаленном суставе, например, нейтрофилы и тучные клетки. Пул из провоспалительных цитокинов, значительную часть которого составляет ФНО-альфа, запускает дифференцировку остеокластов, осуществляющих резорбцию кости, что приводит со временем к необратимому повреждению структуры и функции сустава. Так как хрящевая ткань практически неспособна восстанавливаться, а костная в ходе постоянных процессов разрушения и регенерации деформируется, ревматоидные поражения остаются на всю жизнь [37].

Помимо суставов, воспаление может отмечаться и в других органах. У одной трети пациентов с ревматоидным артритом развивается сухость глаз и полости рта, а также образуются ревматоидные узелки.

Более распространенное воспаление может приводить к фиброзу легких. Воспалиться могут оболочки сердца, легкие и кровеносные сосуды. У пациентов с ревматоидным артритом чаще, чем у лиц без этого заболевания, возникают ишемическая болезнь сердца и сердечная недостаточность. А также чаще встречается остеопороз вследствие сниженной подвижности пациентов, воспаления и/или побочных эффектов лекарственных препаратов, которые используют для лечения ревматоидного артрита, особенно кортикостероидов. Кроме того, использование кортикостероидов может увеличивать риск инфекций и сахарного диабета [38].

Среди широкого спектра «провоспалительных» медиаторов (рис. 3), принимающих участие в развитии этого сложного аутоиммунного заболевания, особое внимание привлечено к фактору некроза опухоли ФНО-

альфа, который рассматривается как основной цитокин, определяющий развитие синовиального воспаления и остеокластопосредованной костной деструкции при артритах. Установлено, что именно неконтролируемая гиперпродукция этого цитокина лежит в основе хронизации иммунопатологического процесса и костной деструкции [1]. Не удивительно, что именно ФНО-альфа в настоящее время является важнейшей «мишенью» для так называемой «антицитокиновой» терапии ревматоидного артрита и других воспалительных заболеваний суставов, таких как анкилозирующий спондилит и псориатический артрит. Это послужило основанием для разработки группы препаратов так называемых ингибиторов ФНО, блокирующих биологическую активность этого цитокина в циркуляции и на клеточном уровне [37, 40]. Подробное описание данных препаратов будет дано ниже.

Кроме того, отмечают также важную роль ФНО-альфа в современной нейроэндокринной теории развития сердечнососудистых заболеваний. Отмечено, что повышение его уровня зарегистрировано у всех больных с сердечной недостаточностью и коррелирует с тяжестью заболевания [11, 12].

Было показано, что патогенетические механизмы, лежащие в основе ФНО-индуцируемой патологии миокарда, весьма многообразны. Например, обратимое кардиодепрессивное действие, проявляющееся нарушением сократительной способности миокарда, продемонстрировано *in vivo* при введении ФНО-альфа лабораторным животным [11, 41, 42] и *in vitro* на моделях изолированного сердца, папиллярных мышц и в культуре кардиомиоцитов [42, 44, 45].

Следует отметить, что ФНО-альфа обладает способностью индуцировать гипертрофию миокарда [46]. У крыс, которым в течение двух недель вводили низкие дозы ФНО-альфа (сопоставимые с уровнем ФНО-альфа в сыворотках больных с сердечной недостаточностью) развиваются прогрессирующее ослабление сократимости миокарда и ремоделирование сердечной мышцы, проявляющееся в деградации фибриллярного коллагена,

гипертрофии кардиомиоцитов, дилатации и уменьшении толщины левого желудочка [47]. Особенно большой интерес представляют данные о том, что патологическое действие ФНО-альфа может быть связано с его локальной экспрессией в миокарде. Этот феномен был обнаружен в острой и хронической стадиях экспериментального вирусного миокардита у мышей [42]. В качестве фундаментального механизма, ведущего к необратимому нарушению сократительной способности миокарда при сердечной недостаточности, рассматривается ФНО-индуцированный апоптоз кардиомиоцитов [42] в то время как ремоделирование сердца обусловлено ФНО-индуцированной эктопической экспрессией кератина 8 и кератина 18 в кардиомиоцитах.

Наряду с вышеуказанным, в исследованиях, опубликованных в 2013 году, была выявлена гиперэкспрессия ФНО-альфа в узлах контрактуры при развитии и прогрессировании болезни Дюпюитрена, известного заболевания как ладонный фиброматоз, в результате которого происходит избыточное развитие соединительной ткани в области сухожилий сгибателей одного или нескольких пальцев, что приводит к рубцовому перерождению и стойкому нарушению функции кисти [11]. Несмотря на то, что болезнь Дюпюитрена была открыта достаточно давно и в медицинской литературе уже имеется множество публикаций на эту тему, доказательство участия ФНО, предполагает, что его нейтрализация при местном применении ингибиторов может стать надеждой на успешное устранение этого заболевания [11, 48].

Помимо всего прочего, ФНО представляет интерес в качестве мишени для фармакологического воздействия при таких заболеваниях, как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и рассеянный склероз [11, 35, 49]. В последнее время все больший интерес вызывает роль ФНО-альфа в развитии и формировании центральной нервной системы, в синаптической передаче и нейрогенезе [11, 35, 49]. Повышение уровня ФНО-альфа в плазме крови и ликворе у больных рассеянным склерозом считают важным

патогенетическим феноменом процессов аутоиммунного воспаления и нейродегенерации в ЦНС [11].

Вместе с тем, среди большого количества медиаторов воспаления отмечают особую роль ФНО-альфа в дисфункциях сосудистого эндотелия. Показано, что цитокин способствует повышению проницаемости эндотелия, накоплению нейтрофилов и макрофагов в тканях, усилению прокоагулянтных и ослаблению антикоагулянтных свойств эндотелия. ФНО-альфа может запускать сигнальные каскады, ведущие к апоптозу эндотелиальных клеток *in vitro*, что, предположительно, может усиливать прокоагулянтные свойства сосудов и усиление их проницаемости *in vivo* [11, 50].

В то же время ФНО-альфа в течение многих лет привлекает внимание исследователей, фармакологов, клиницистов, что связано с его избирательной способностью тормозить рост и вызывать лизис злокачественных клеток, геморрагический некроз опухолей, активировать иммунный противоопухолевый ответ, оказывая повреждающее действие на сосуды [51].

Таким образом, роль ФНО-альфа, как участника в регуляции различных физиологических и патологических процессов в организме человека настолько многозначна, что дальнейшее изучение его биологической активности и особенностей механизмов ее реализации послужит основанием для детальной разработки новых подходов клинического применения данной молекулы в целях регуляции продукции ФНО-альфа.

2.2 Моноклональные антитела к ФНО-альфа в лечении ревматоидного артрита и других заболеваний

Установление ведущей роли ФНО-альфа в иммунопатогенезе целого ряда заболеваний явилось основанием для разработки «антицитокиновой» терапии моноклональными антителами с высокой специфичностью. Это позволило существенно снизить риск генерализованной иммуносупрессии,

которая характерна для многих лекарственных средств, в первую очередь, глюкокортикоидов и цитотоксиков. Наконец, изучение клинических и иммунологических эффектов «антицитокиновых» мАТ предоставило возможность получить принципиально новые факты о роли тех или иных воспалительных медиаторов в патогенезе заболеваний [1].

Современная концепция ведения пациента с ревматоидным артритом ориентирует врача на достижение полной или частичной ремиссии и предусматривает необходимость назначения максимально активной (агрессивной) терапии базисными противовоспалительными препаратами (БПВП) в первые месяцы болезни на основании ранней диагностики этого недуга [1, 2]. Но достижение стойкой клинической ремиссии за последние 10 лет стало реально достижимой задачей для практикующих ревматологов только в связи с внедрением современных методов терапии биологическими препаратами [3, 12], что оказало действительно большое влияние на результаты лечения пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит. В отличие от всех прежде использовавшихся препаратов эти средства обладают существенным потенциалом для улучшения исхода заболевания и повышения качества жизни пациентов [12]. Применение данных анти-ФНО-агентов привело к новым и интересным результатам. Их эффективность при РА уже достаточно изучена [2]. Получены впечатляющие результаты, свидетельствующие о том, что удастся повысить эффективность лечения РА на 50-60% по сравнению со стандартной базисной терапией, включая высокие дозы метотрексата [52]. К настоящему времени сложилось устойчивое мнение [53-56], что ингибиторы фактора некроза опухолей на основе мАТ высокоэффективны при ревматоидном артрите, являются действенными безопасными средствами, их эффективность сохраняется в течение длительного периода, в отличие от многих других антиревматических препаратов, при приеме которых эффективность снижается, а так же являются дорогостоящими как для системы здравоохранения, так и для пациентов, которые проводят частичную

оплату медикаментов. Можно считать, что с внедрением биологических препаратов антагонистов фактора некроза опухолей появилась новая надежда для пациентов с ревматоидным артритом, у которых ранее нельзя было контролировать воспаление, предотвратить разрушение сустава или прогрессирования инвалидности.

В настоящее время на мировом фармацевтическом рынке существует 5 основных блокаторов ФНО-альфа (рис. 4 [36]) на основе мАТ [2]: инфликсимаб, этанерцепт, адалимумаб, голимумаб и цертолизумаб пегол.

Моноклональное антитело инфликсимаб является первым препаратом из группы ингибиторов ФНО-альфа [2]. В связи с тем, что его коммерческое применение началось в 1998 г., на настоящий момент имеется огромный опыт использования этого мАТ в лечении ревматоидного артрита и других заболеваний [36, 51, 56-58].

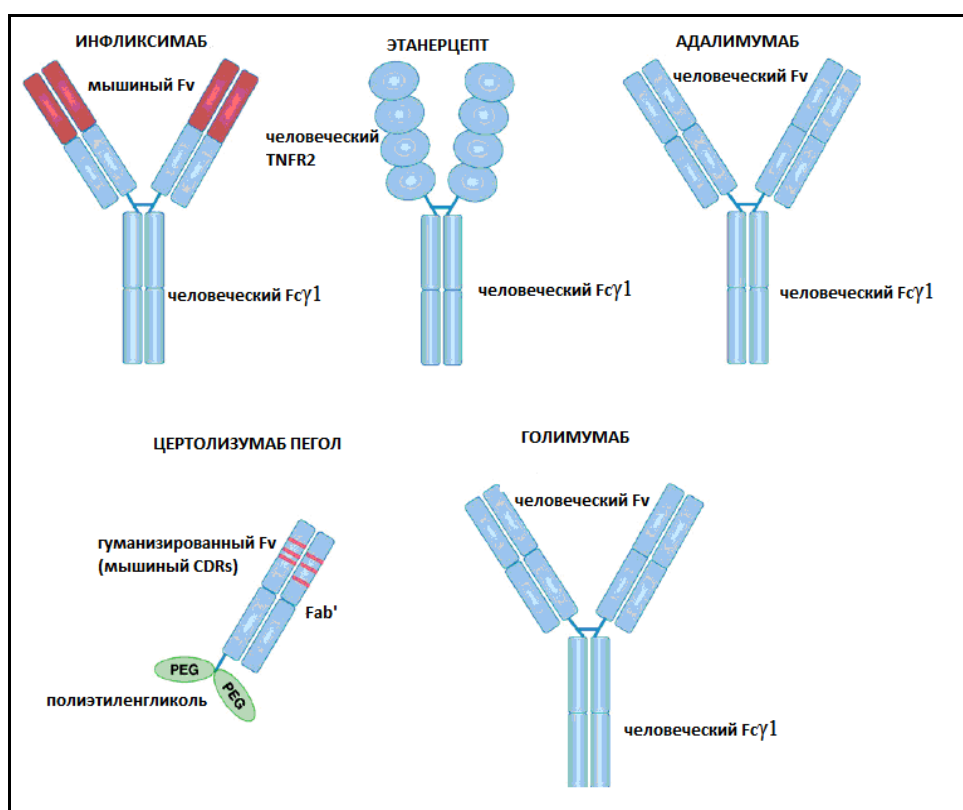


Рисунок 4 – Структура известных ингибиторов ФНО-альфа на основе моноклональных антител

Было показано, что инфликсимаб подавляет патологические эффекты ФНО-альфа посредством специфического связывания и нейтрализации как свободного, так и трансмембранного ФНО, а также лизиса ФНО-

продуцирующих клеток путем. В России с 2001 г. инфликсимаб первоначально был зарегистрирован для лечения болезни Крона и ревматоидного артрита [59]. В последующем спектр его показаний был расширен, и в настоящее время, его эффективность была показана также в лечении серонегативных спондилоартропатий (болезни Бехтерева и псориатической артропатии) [61], системных васкулитах [62], ювенильном артрите [63], системной красной волчанке [64] и дермато- и полимиозите [65, 66], в лечении вторичного амилоидоза [67].

Этанерцепт занимает особое место в истории применения рекомбинатных белков в клинической практике, поскольку он является первым генноинженерным биологическим препаратом, полностью состоящим из человеческого белка [68]. Это представляет его главное преимущество перед применением инфликсимаба, который в своем составе содержит 25% мышинового [68-72]. Кроме того, комбинированная конструкция из человеческого р75 рецептора и Fc-фрагмента (CH2 и CH3 области) человеческого IgG1 в 5-8 раз увеличивает период полувыведения данного препарата [73, 74]. Способность нейтрализовать не только ФНО-альфа, но и ФНО-бета, также обуславливает его терапевтические преимущества. Следует также заметить, что этанерцепт может применяться в качестве монотерапии, а инфликсимаб – исключительно в сочетании с метотрексатом [58, 68, 74].

Этанерцепт показан при лечении умеренного и тяжелого активного полиартикулярного ювенильного идиопатического артрита у пациентов в возрасте 2 лет и старше, для уменьшения симптомов и замедления прогрессирования структурных повреждений при активном артрите и улучшения функции у пациентов с псориатическим, с активным анкилозирующим спондилитом, а также для лечения взрослых пациентов (в возрасте 18 лет и старше) с хроническим умеренным или тяжелым псориазом с наличием бляшек, которым показана системная терапия или фототерапия [75].

Другим представителем группы блокаторов ФНО-альфа следует отметить мАТ адалимумаб как основной биологический препарат [76] для

лечения РА и других наиболее распространенных воспалительных артропатий в настоящее время. Адалимумаб разрешен для применения в США (2002 г), странах Западной Европы (2003 г.) и в России (2006 г) [77]. Основное показание для его применения, как и других ингибиторов ФНО-альфа – тяжелый или умеренно тяжелый РА, при котором недостаточно эффективны один или более базисные противовоспалительные препараты [68].

Адалимумаб связывается с двумя формами ФНО-альфа. Связывание с растворимой формой способствует подавлению экспрессии медиаторов воспаления и, тем самым, предотвращает дегенерацию тканей и прогрессирование инвалидности при аутоиммунных патологиях. Однако, связывание трансмембранной формы ФНО-альфа, обуславливает эффекторные функции антитела. Благодаря взаимодействию специфического рецептора третьего типа FcγRIIIA на NK-клетках с Fc областью мАТ адалимумаб происходит высвобождение цитотоксических гранул, что приводит к лизису клеток-мишеней, активно экспрессирующих ФНО-альфа. Этот механизм известен как антителозависимая цитотоксичность (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC). Кроме того, Fc область мАТ адалимумаб также является превосходным индуктором механизма комплемент-зависимой цитотоксичности.

Адалимумаб характеризуется следующими чертами, отличающими его от других блокаторов ФНО-альфа [78-82]. Это полностью человеческое антитело к ФНО-альфа, что обуславливает его сниженную иммуногенность. Преимущество этого мАТ заключается в возможности его самостоятельного применения больными в амбулаторных условиях - метод введения и режим дозирования удобны для большинства пациентов; а также в его широком спектре применения против воспалительных заболеваний разной природы, таких как ревматоидный артрит [5], псориаз [6], болезнь Крона [7] и др. Важно отметить, что в 2016 году Адалимумаб получил свое десятое назначение, на этот раз для лечения неинфекционных увеитов [8]. Допустимо применение адалимумаба как в комбинации с метотрексатом и другими

БПВП, так и в монотерапии. Для адалимумаба характерна стабильность эффекта при многолетнем применении. В мире имеется большой положительный опыт применения адалимумаба для лечения воспалительных ревматических заболеваний, включая результаты многочисленных рандомизированных клинических исследований, при этом эффективность и безопасность лечения этим препаратом как минимум не уступает таковым для других блокаторов ФНО [78, 83]. При его раннем назначении в комбинации с метотрексатом больные РА в два раза чаще достигают ремиссии или низкой активности заболевания, чем при раннем назначении монотерапии. Своевременное применение такой комбинации способствует длительному – не менее 10 лет – контролю заболевания [81, 82]. В 2007 г. компании Abbott была присуждена Премия Галена (Galen Prize) за препарат Хумира, как за лучший биотехнологический продукт года [80].

Истечение срока патентной защиты в США 2016 г. и потеря европейской эксклюзивности в 2018 г. открыли заманчивую возможность созданию его биоаналога, который послужит надеждой на эффективное лечение как для всех нуждающихся пациентов.

Интересно, что в 2013 году впервые было проведено исследование, посвященное структурному наблюдению и анализу взаимодействия моноклональных антител с рецепторами ФНО, что предоставило прямые доказательства клинического преимущества терапии мАТ Адалимумаб в сравнении с применением инфликсимаба и этернацепта на молекулярном уровне [81, 82]. Было показано, что адалимумаб демонстрирует относительно более высокую аффинность наряду с вышеуказанными блокаторами ФНО-альфа с K_D в пределах от $7,05 \times 10^{-11}$ М до $1,0 \times 10^{-10}$ М [81, 82] что определяет его более выраженную активность в отношении ФНО-альфа. Трехмерные структуры комплексов ФНО-альфа с антиген-связывающими участками мАТ адалимумаб и инфликсимаб, показанные на рисунках 5-7 [81, 82], иллюстрируют взаимодействие паратопов антител с антигенной детерминантой, в данном случае ФНО-альфа, которое препятствует связыванию лигандов с рецептором, тем самым блокируя его биологическую активность.

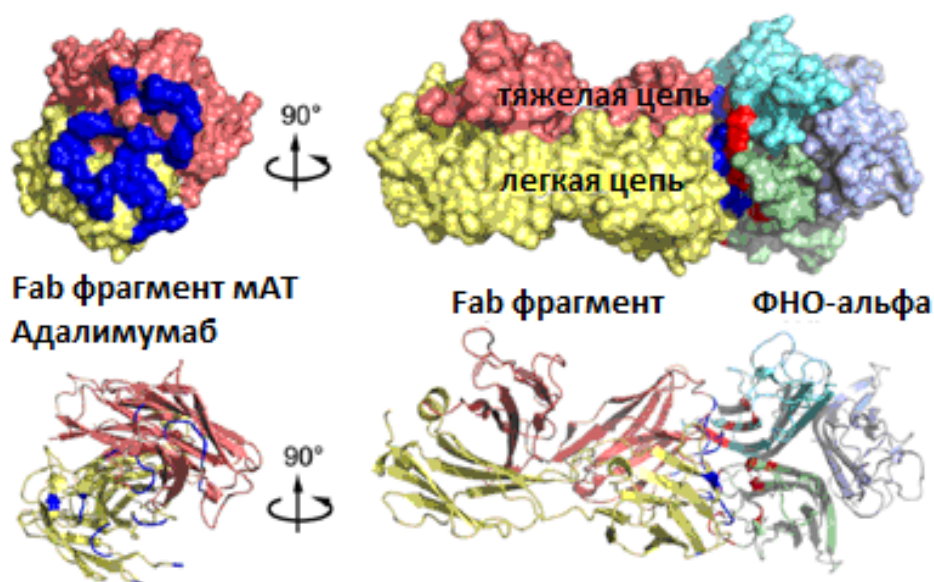


Рисунок 5 – Трехмерная структура комплекса ФНО-альфа с антиген-связывающим участком (Fab-фрагментом) МАТ адалимумаб

Легкая цепь и тяжелая цепь участка Fab-фрагмента МАТ адалимумаб окрашены в желтый и красный, соответственно. Активная форма гомотримера ФНО-альфа окрашена в голубой, зеленый и фиолетовый цвет. Поверхность контакта выделена синим цветом на Fab-ададимумаб и красным на молекуле ФНО-альфа.

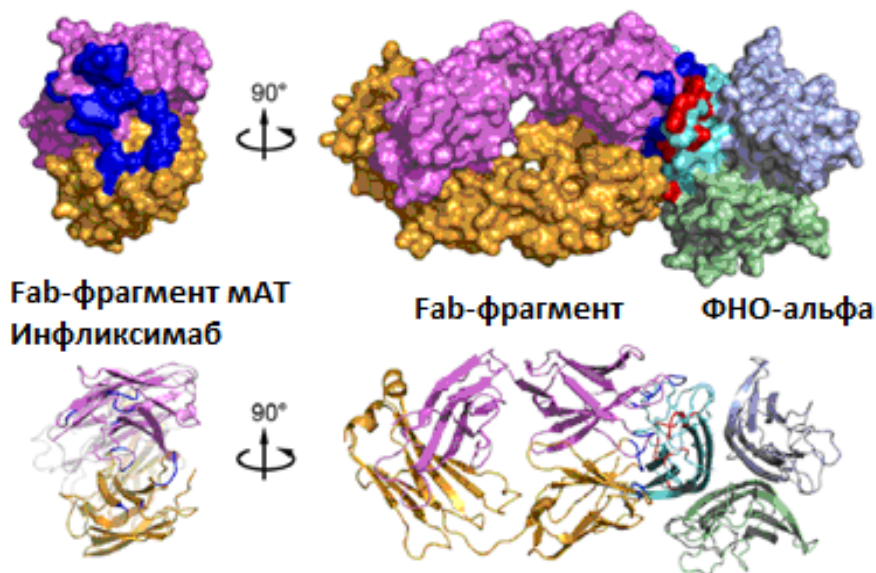
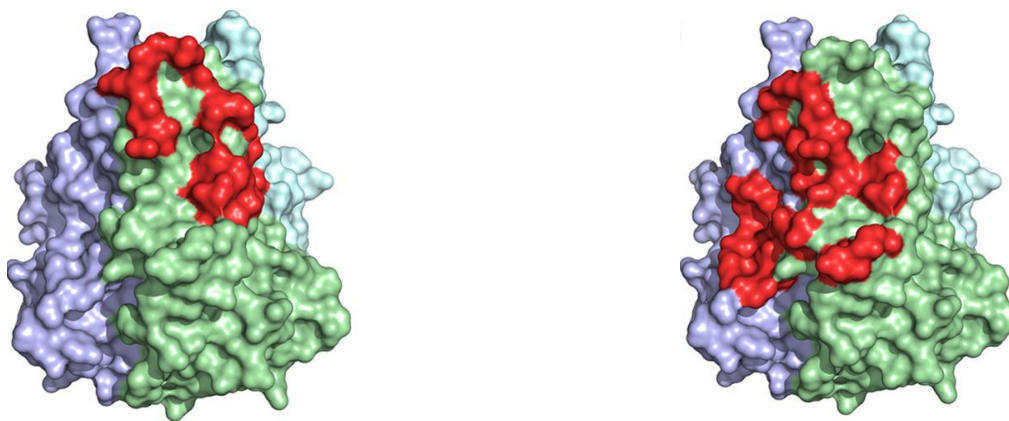


Рисунок 6 – Трехмерная структура комплекса ФНО-альфа с антигенсвязывающим участком (Fab-фрагментом) МАТ инфликсимаб
Легкая цепь и тяжелая цепь участка Fab-фрагмента МАТ инфликсимаб окрашены в золотой и малиновый, соответственно. Активная форма гомотримера ФНО-альфа окрашена в голубой, зеленый и фиолетовый цвет. Поверхность контакта выделена синим цветом на Fab-инфликсимаб и красным на молекуле ФНО-альфа.



ФНО-альфа – Fab-инфликсимаб

ФНО-альфа – Fab-адалимумаб

Рисунок 7 – Сопоставление площади поверхностей связывания ФНО-альфа с антигенсвязывающими участками (Fab-фрагмента) мАТ инфликсимаб и адалимумаб. Красным цветом выделен эпитоп ФНО-альфа

Несмотря на вышеуказанное, на настоящий момент нет строгих доказательств того, что какой-либо блокатор ФНО-альфа эффективнее других препаратов этой группы и должен использоваться первым. Анализ результатов многочисленных клинических исследований свидетельствует об одинаково высокой эффективности инфликсимаба, этанерцепта и адалимумаба при лечении взрослых больных с ревматоидным артритом и детей с ювенильным ревматоидным артритом [84]. Они включены в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП) и рекомендуются в качестве вариантов лечения у пациентов в случае неэффективности или непереносимости других БПВП, в том числе хотя бы одного из ингибиторов ФНО-альфа, что позволяет за короткий период значительно уменьшить выраженность клинико-лабораторных проявлений заболевания и замедлить костную деструкцию [52-54, 68].

Следует отметить, что согласно Распоряжению Правительства РФ от 28.12.2016 № 2885-р в перечень ЖНВЛП для медицинского применения на 2017 год были включены два новых варианта нейтрализации ФНО-альфа с помощью антител, один из которых – не цельная молекула гуманизированного антитела к этому цитокину, а ее Fab-фрагменты, соединенные с полиэтиленгликолем – Цертолизумаб пегол [85-89], другой – Голимумаб, –

полностью человеческое мАТ класса IgG1к. Обе терапевтические молекулы в ходе клинических испытаний сумели доказать свою эффективность в лечении артритов различной этиологии, а также язвенного колита [90-94] наряду с другими ингибиторами, однако, являются сравнительно новыми в сфере антицитокиновой терапии на основе моноклональных антител и довольно дорогостоящими, что ограничивает их широкое применение для лечения аутоиммунных заболеваний.

Ввиду высокой стоимости оригинальных ингибиторов ФНО-альфа, врачи вынуждены руководствоваться, во-первых, преимуществом того или иного препарата перед другими блокаторами на основе накопленного опыта в сфере его применения, а во-вторых, рассматривать назначение биосимиляров или биоаналогов в качестве альтернативы, как экономически более доступного вида терапевтических молекул такого рода, которые ничуть не уступают по эффективности оригинальным препаратам [95-97]. В связи с чем, разработка биоподобных терапевтических молекул сегодня является крайне актуальной задачей, решением которых занимаются многие фармацевтические компании всего мира.

Среди основных факторов повышения заинтересованности к созданию биосимиляров указывают умеренную цену по сравнению с оригинальными продуктами, широкую сферу применения, а также возможность увеличить эффективность. Сейчас на фармацевтическом рынке можно встретить общие версии названий таких биопрепаратов, например, "biosimilars" в Европе, "follow-in pharmaceuticals» в США и Японии, "subsequent entry biologic" в Канаде, "biocomparables" в Мексике [3]. Впервые термин «биосимиляр» и его определение появились в 2003 г. в директиве Европейского союза, где подчеркивалась важность отличий биосимиляров от дженериков [4]. Впоследствии ЕМЕА разработало ряд руководств, касающихся биопрепаратов и биосимиляров, которые регулярно пересматриваются и обновляются [4]. Российская законодательная база по биосимилярам в

настоящее время находится на стадии разработки. Однако, в 2014 году в рамках экспертной сессии, посвященной этой проблеме, был обсужден проект «О внесении изменений в Федеральный закон № 61 “Об обращении лекарственных средств”», касающийся создания нормативно-правовой базы по регистрации лекарственных препаратов. Кроме того, в связи с поставленной задачей снижения импортозависимости российского рынка лекарств и повышения общей доступности новых препаратов в рамках Приказа Министерства промышленности и торговли РФ от 23 октября 2009 г. №965 “Об утверждении Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года”, назревает необходимость развития мощного сегмента биофармацевтической промышленности с целью разработки технологий производства современных высокоэффективных отечественных лекарственных препаратов, в первую очередь на основе моноклональных антител.

Таким образом, учитывая, что доступность биоаналогов новых ингибиторов ФНО-альфа цертолизумаб пегол и голимумаб будет возможна только к 2024 г. по истечении срока их патентной защиты, то, очевидно, актуальным на сегодня рассматривают разработку технологии получения одного из наиболее эффективных ингибиторов ФНО-альфа – отечественного аналога полностью гуманизированного моноклонального антитела адалимумаб с целью повышения его доступности, патентная защита на который истекает в 2018 году.

2.3 Современные тенденции в разработке технологий получения биофармацевтических препаратов

Стремительное развитие биотехнологической фарминдустрии позволило перейти медицине на совершенно новый уровень и решить многие проблемы диагностики и лечения серьезных заболеваний, многие из которых раньше считались неизлечимыми.

Главным преимуществом лекарственных препаратов, полученных биотехнологическим путём, является их высокая специфичность по

отношению к факторам, связанным с возникновением и развитием болезни. Этот подход позволил создать ряд инновационных генноинженерных препаратов на основе цитокинов, гормонов, факторов крови, ферментов и, главным образом на основе моноклональных антител, которые занимают ведущее место среди разрабатываемых биотехнологических продуктов для иммунодиагностики, терапии рака и других заболеваний.

Ключевым моментом в условиях нынешней конкуренции на биофармацевтическом рынке, где зачастую несколько компаний работают над технологией одного и того же препарата, является разработка экономически эффективного и современного производственного процесса, в первую очередь направленного на поддержание желаемых характеристик качества и увеличение выхода целевой молекулы при одновременном сокращении времени от возникновения идеи нового продукта до его появления на рынке. Помимо всего прочего, успешная реализации разрабатываемой технологии биофармацевтического препарата требует оптимизации целого ряда параметров, где каждый последующий этап зависит от предыдущего.

Важным аспектом формирования перспективной стратегии будущей технологии является процесс разработки нового продуцента, то есть этап создания стабильной клеточной линии, способной синтезировать необходимые молекулы с высокой производительностью, сохраняя при этом низкие эксплуатационные затраты. В последнее время особое внимание уделяют инновациям, направленным на ускорение и автоматизацию именно на этом этапе разработки технологии, так как выбор одного перспективного клона из огромного числа претендентов – довольно длительный и трудоемкий процесс. Сегодня на биофармацевтическом рынке производители предлагают такие мощные автоматизированные инструментари, как Cell Metric (Solentim, Великобритания), Single cell printer (Cytena, Германия), ClonePix (ThermoFisher, США), Ambr и Fill-It (Sartorius, Германия) и другие для высокоэффективного скрининга клонов,

обеспечения моноклональности клеточной линии, быстрой оптимизации условий культивирования и упрощения процедуры создания клеточных банков. Например, использование системы минибioreакторов Ambr позволяет существенно сократить время исследований и добиться максимально возможного выхода целевого продукта с минимальными затратами времени и реагентов, протестировав большое количество вариантов [98]. Система Fill-It обеспечивает автоматизированный и асептический розлив клеточной суспензии по криопробиркам согласно GMP стандартам для последующей криоконсервации, что сокращает время подготовки клеточных банков, гарантирует однородность клеток, минимизацию потери жизнеспособности и существенно снижает риски контаминации образцов по сравнению с ручным режимом [98].

Следует отметить, несмотря на ряд преимуществ подобных современных решений, их применение оправдано больше для крупных компаний, где соотношение между полученными результатами и затратами труда, а также средств производства, будет максимально эффективным.

Наряду с наиболее распространенными и доступными методиками ускорения процесса разработки, применяющимися многими иностранными и отечественными компаниями, одно из приоритетных направлений современной биотехнологии занимает особое место переход к одноразовым и автоматизированным технологиям [98] на этапах масштабирования, выделения и очистки.

Системы одноразового применения – Single-use systems (SUS) – в настоящее время широко используются в процессах производства биопрепаратов [98, 99]. Одноразовые системы фильтрации, расходные материалы, биореакторы – это наиболее часто используемые виды оборудования в производстве препаратов для доклинических и клинических испытаний. В то же время биофармацевтическая промышленность расширяет использование SUS в процессах приготовления лекарственных форм. Исследователи прилагают совместные усилия для преодоления

существующих ограничений (стандартизация, усовершенствование датчиков), разработки улучшенных решений для автоматизации и хроматографии при помощи оборудования одноразового применения в крупномасштабном производстве.

Комплексное использование одноразовых автоматизированных систем позволяет оптимизировать работу лаборатории, отобрать наиболее эффективную линию и приступить к масштабированию процесса в 5–50 литровых биореакторах с процессом, уже отработанным в условиях, максимально приближенных к реальному производству.

Важно отметить, что в качестве дополнительных решений для ускорения процесса создания высокоэффективного клона-продуцента используют быстрые схемы селекции, новые селективные агенты, высокоэффективные экспрессионные конструкции и методы трансфекции, альтернативные стратегии отбора клонов с уменьшением количества раундов селекции и отказом от амплификации и т.д.

Вторым важным аспектом успешной реализации технологии является этап, касающийся оптимизации условий культивирования, то есть выбор состава питательной среды, режима, аппаратного оформления технологии, а также разработке соответствующих систем онлайн и офлайн сенсоров, гарантирующих исчерпывающий объем информации для понимания и управления технологическим процессом с целью дальнейшего масштабирования и обеспечения необходимой производительности и требуемого качества белка.

Внедрение одноразовых технологий наряду с автоматизацией как в процессах культивирования (стадии up-stream, USP), так и выделения и очистки (стадии down-stream, DSP), позволило заменить традиционные подходы по-настоящему гибким концептуальным дизайном для быстрого масштабирования за счет увеличения количества экономически эффективных производственных единиц. Благодаря достижениям современной биотехнологии стало доступно широкое применение модульных систем,

благодаря которым можно легко расширять и адаптировать оборудование под специфический процесс [100]. Это упрощает репликацию (клонирование) процесса, так что производственные мощности могут быть установлены в любой точке мира всего за несколько месяцев без необходимости новой разработки и характеристики процесса в более крупном масштабе. В результате использование таких «гибких» объектов, как модульные системы или технологические платформы, позволяет минимизировать затраты на этапах производства на доклинические и клинические исследования и, следовательно, минимизировать риски, одновременно оптимизируя время выхода на рынок и глобальное распределение без каких-либо проблем, связанных с логистикой.

В последнее время стремительно растет интерес к использованию перфузионных систем взамену периодического режима культивирования *fed-batch* (культивирование в замкнутом объеме с подпитками). В условиях перфузионной системы используют непрерывную подачу среды для культивирования клеток, в то время как побочные продукты, ингибирующие рост, постоянно удаляются на протяжении всей фазы производства (обычно более 20 дней), чтобы достичь плотности клеток в 10-30 раз выше, чем в реакторах в периодическом режиме культивирования [101]. Увеличение продолжительности процесса, возможность поддержания постоянного состава среды и параметров процесса культивирования, обеспечение быстрого и непрерывного выведения продукта гарантирует более высокое и стабильное качество целевой молекулы, всё вышеуказанное является преимуществами перфузионной системы не только в целях повышения производительности (в пересчете на мг/л/сутки), по крайней мере, в 4 раза по сравнению с периодическим культивированием в биореакторе того же объема [102], но и делает ее незаменимой для производства, в первую очередь нестабильных молекул. Реализация перфузионных реакторов была успешно коммерциализована: от крупных биофармацевтических компаний, таких как Pfizer, Genentech, Shire и Genzyme/Sanofi [103-105], до небольших

компаний и инновационных производителей вакцин, таких как CMC Biologics и Crucell [106, 107]. Несмотря на некоторые недостатки в технологии, такие как использование больших объемов среды и высокий уровень подготовки операторов, сложности валидации, экономический выигрыш использования «компактных» перфузионных систем играет важную роль в процессах разработки технологий и производстве биотехнологических продуктов [102, 108].

Интенсивное развитие технологий в сфере выделения и очистки белка из культуральной жидкости сегодня также позволяют использовать современные одноразовые системы фильтрации в целях обеспечения легкой адаптируемости к различным масштабам, а также к повышению эффективности стадий выделения и очистки. Сегодня фильтрация является отличной альтернативой центрифугированию благодаря более простой реализации и масштабированию [109]. Например, одноразовая фильтрующая система Stax (Pall, США) и многофункциональная система Allegro MVP (Pall, США) являются универсальными и надежными платформами, которые могут использоваться в разных режимах в зависимости от процесса [110]. Clarisolve Millipore, а также адсорбционные системы глубинной фильтрации D0HC и X0HC применяют для первичного или вторичного осветления культуральной жидкости непосредственно из биореактора с целью максимизации нагрузки на хроматографические колонки [111] и позволяют с большой эффективностью осветлять большие партии в системах SUS, как это было продемонстрировано в случае Sartoclear Dynamics (Sartorius Stedim Biotech, Германия) [112].

На сегодняшний день сочетание возможностей современной биотехнологии создавать высокопроизводительные клеточные линии и осуществлять полномасштабное производство требуемого количества целевой молекулы постепенно сместило фокус к развитию более жесткой системы контроля качества и последовательности процесса на всех этапах. В связи с этим с целью повышения качества разрабатываемого продукта

современная биотехнология предлагает массу стратегий и подходов для решения проблем, например, связанных с особенностями физико-химических свойств белковых молекул, таких как агрегация, токсичность по отношению к клеткам-хозяина, нестабильность, снижение эффективности из-за неправильного профиля гликозилирования, растворимость, деградация по разным механизмам, включающим окисление, дезамидирование, изомеризацию, фрагментацию и т.д.

Несмотря на то, что стремительное развитие технологий предоставляет огромные возможности для разработки экономически эффективного и современного производственного процесса получения биофармацевтических препаратов, фармкомпании пока не спешат отказываться от традиционных подходов, которые также успешно реализуются. Стоит отметить, что только наличие полностью одноразовых и автоматизированных систем не является залогом успешной реализации технологии и не дает полностью гарантии, в конечном счете в обеспечении получения целевой молекулы в требуемом количестве и качестве. Помимо всего прочего, ключевыми моментами являются эффективное и грамотное планирование работ, организация коллектива, максимально правильный выбор контрольных точек, критических параметров процессов, распределения ответственности и т.д. Кроме того, владение современными автоматизированными системами и их обслуживание для небольших фармкомпаний является экономически неоправданным. Однако, безусловно, будущее биотехнологической фарминдустрии стоит за использованием полностью одноразовых, непрерывных и автоматизированных систем производства, что позволит исключить человеческий фактор и поспособствует улучшению контролю процесса согласно инициативами в области качества QbD (англ. Quality by Design – качество на этапе разработки) [113-115], поможет снизить затраты на производство, и, таким образом, обеспечить людей жизненно необходимыми современными лекарственными средствами.

2.4 Этапы создания стабильной клеточной линии для экспрессии моноклональных антител

Рекомбинантные (химерные, гуманизированные или полностью человеческие) антитела относятся к активно развиваемому высокоэффективному сегменту фармацевтических препаратов биологического происхождения. Возрастающая роль рекомбинантных антител в терапии онкологических, аутоиммунных, инфекционных заболеваний требует разработки производительных способов их биосинтеза в клеточных линиях млекопитающих. В фармацевтической индустрии задача производства терапевтических антител решается путем селекции стабильных клеточных линий-продуцентов и их адаптации к ферментации.

Процесс создания стабильной клеточной линии (рис. 8), продуцирующей целевой рекомбинантный белок, обычно включает следующие этапы: сборку экспрессионного вектора, его введение в клетки-реципиенты (трансфекция), отбор клонов по наличию селективного маркера и продуктивности, анализ стабильности экспрессии и масштабирование [116].

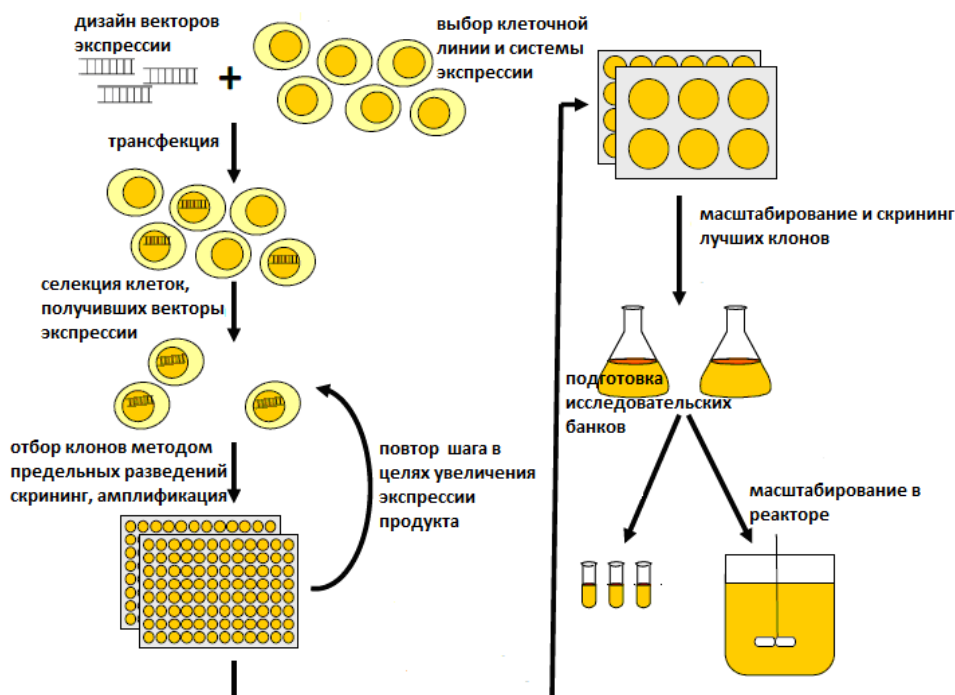


Рисунок 8 – Схема создания клона-продуцента рекомбинантного белка

Одним из важных моментов в процессе создания продуцента является выбор клеточной линии и системы экспрессии [116-118]. Исторически сложилось так, что эукариотические клетки, такие как Sp2/0, NS0 (клетки мышинной миеломы), PER.C6 (клетки сетчатки глаза человека), HEK-293 (клетки почки эмбриона человека), CHO (клетки яичников китайского хомячка) были главным образом выбраны для производства сложных гликопротеинов, особенно для экспрессии моноклональных антител, из-за их преимуществ перед другими клеточными системами экспрессии [116, 119, 120].

В первую очередь, использование эукариотических культур – это гарантия правильного синтеза и широкого спектра посттрансляционных модификаций рекомбинантного белка, точное удаление лидерной последовательности в ходе секреции, а также правильный фолдинг [116-119]. Кроме того, эукариотические клетки обладают способностью секретировать нативные белки в культуральную жидкость (КЖ), что облегчает процедуры выделения и очистки.

Среди линий клеток млекопитающих, используемых в биофармацевтическом производстве, линия клеток яичника китайского хомячка CHO (Chinese hamster ovary cells) и ее производные являются наиболее распространенными [120]. Некоторые сублинии CHO отличаются инактивацией либо гена дигидрофолатредуктазы (DHFR), либо гена глутаминсинтетазы (GS), что позволяет, путем добавления ингибиторов DHFR или GS, относительно легко проводить амплификацию введенных в геном клетки генетических конструкций, содержащих соответствующие минигены. В частности, путем мутагенеза химическими агентами из базовой линии CHO были получены сублинии CHO-DG44 и CHO-DXB11 [121, 122], не содержащие активных аллелей DHFR и пригодных для получения стабильных линий-продуцентов рекомбинантных белков [116-118, 123, 126-129]. Это событие отметило отправную точку коммерческого использования клеток CHO в биотехнологии. Позднее были разработаны линии клеток CHO-K1 и CHOK1SV для GS-амплификации под действием метионинсульфоксимины (MSX) [124, 125].

В последние несколько лет появились современные методы редактирования геномов – системы TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) и CRISPR (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9 [130], которые уже зарекомендовали себя как надежные инструменты геномной инженерии и представляют перспективную область в сфере получения новых клеточных линий на основе культуры клеток CHO. Их отличает относительная простота конструирования и высокая эффективность с целью регуляции (запуска, модуляции, отключения) различных физиологических процессов в клетке – пролиферации, дифференцировки, апоптоза, метаболических путей, посттрансляционных модификаций, экспрессии белков и т.д. [120, 130].

Эффективный синтез рекомбинантных белков зависит не только от используемых клеточных линий. Основное влияние на этот процесс оказывают конструкция экспрессирующего вектора, а также сам метод введения рекомбинантных ДНК в эукариотические клетки. В последнем случае низкая эффективность доставки рекомбинантных молекул в клетки и неоптимальная локализация сайтов их интеграции в геном могут свести на нет все достоинства клеточных линий и экспрессирующих векторов [128].

Для внедрения ключевого гена в клетки продуцентов с целью стабильной экспрессии векторы должны содержать, по крайней мере, следующие ключевые элементы [116-120, 128]: геномную или матричную последовательность ДНК интересующего белка (GOI), включающий промоторно-энхансерный участки вирусного гена и терминатора транскрипции или поли-А хвост, бактериальный и эукариотический гены устойчивости к антибиотикам.

Выбор регуляторных элементов экспрессионных конструкций – не менее ответственный этап создания штамма-продуцента. Основным элементом является промотор, который содержит участок узнавания РНК-полимеразы, без которого невозможна инициация транскрипции. В качестве промотора в настоящее время обычно используется промотор предранних

генов цитомегаловируса человека (hCMV), обладающий достаточно высокой эффективностью [131, 132], а так же другие вирусные промоторы, такие как CMV, SV40, CaMV 35S, RSV и их модификации CMV/IntronA, IA2, SV40/CMV и др.

Одним из недостатков вирусных промоторов является их чужеродный по отношению к эукариотическим клеткам характер, вследствие чего они сильно подвержены выключению из-за эпигенетических факторов. Предлагается два решения этой проблемы: модификация нуклеотидных последовательностей промоторов или использование эукариотических, например, промоторов генов β -актина, фактора элонгации EF-1 α или убиквитина UbC, десмина [134, 135] или создание синтетических промоторов.

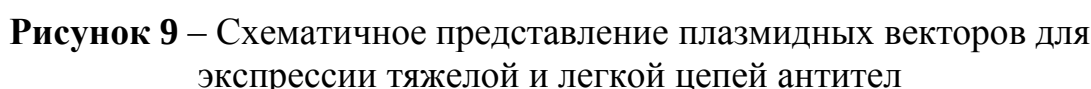
С целью повышения эффективности трансфекции и стабильности экспрессии трансгена широко используют последовательности ДНК, обычно А/Т-богатые, которые, как показано в экспериментах *in vitro*, взаимодействуют с фракцией ядерного матрикса (MAR, matrix attachment region) [116, 136-138]. Существующая модель предполагает, что MAR-элементы, взаимодействуя с белками ядерного скелета, снижают зависимость уровня экспрессии генов, фланкированных MAR, от негативного эффекта окружающего хроматина. Кроме этого, для защиты транскрипции трансгена от репрессии и негативного эффекта окружающего генома широко используют известные инсуляторы [139-141]. Такие элементы увеличивают как эффективность получения трансгенов, так и уровень экспрессии самого трансгена. Однако, далеко не во всех культурах клеток и организмах это работает эффективно. В биотехнологии также используют протяженные участки ДНК, включающие промоторы генов «домашнего хозяйства» (UCOE) [142-144], и регуляторные элементы, обладающие способностью блокировать распространение зон гетерохроматина [142, 145], таким образом, повышая продуктивность и стабильность продуцентов. Например, в работе Нематпур [144] была проведена оценка профиля экспрессии и

стабильности различных UCOE-содержащих векторных комбинаций в мАТ-продуцирующих клетках СНО. Было показано, что UCOE значительно повысил уровень и стабильность экспрессии антитела.

Классическим примером экспрессии моноклональных антител в клетках СНО является котрансфекция с использованием комбинации двух плазмид, где каждый ген (легкой и тяжелой цепей) находится под управлением собственного промотора и транскрибируется отдельно (рис. 9А) [117, 128, 146-149]. Существует ряд недостатков данного подхода. Помимо того, что после ко-трансфекции существует вероятность не только фрагментации векторов, но и даже их удаление из генома в результате перегруппировки ДНК [127, 150, 151], велик шанс образования неэкспрессирующих клонов, выживающих во время селекции [152]. Было показано, что при использовании ко-трансфекции относительное количество каждого вектора, интегрированного в хромосому, изменяется от одной клетки к другой [146, 153, 155]. Это может послужить причиной бесконтрольной экспрессии тяжелой и легкой цепей антитела и отразится в дальнейшем на продуктивности будущего клона-продуцента.

В настоящее время широкое применение находят мультипромоторные конструкции (рис. 9 Б) [146], которые, казалось бы, должны обеспечивать равную экспрессию генов тяжелой и легкой цепей, например, векторов с сайтом внутренней посадки рибосомы вируса энцефаломиокардита (IRES EMCV) или на основе последовательностей, кодирующих саморасщепляющиеся 2А-пептиды.

Было показано, что данный метод увеличения эффективности трансфекции и экспрессии все равно не обеспечивают контроль над соотношением экспрессии генов тяжелой и легкой цепей антитела, так как использование нескольких промоторов в тесной последовательности может привести к транскрипционной интерференции, то есть активная единица транскрипции будет подавлять экспрессию другой в зависимости от места интеграции в геном [146, 156, 157]. Однако, отмечают, что при получении



Мультицистронные векторы (рис.9 С), несущие внутренний сайт посадки рибосомы (IRES), например, маркер селекции неомицинофосфотрансферазы (NPT), по сравнению с часто используемыми векторами позволяют экспрессировать тяжелую и легкую цепи с одного вектора под контролем одного промотора. К преимуществам таких

конструкции относят, во-первых, минимальный риск появления неэкспрессирующих клонов. Во-вторых, повышение стабильности экспрессии мАТ без амплификации генов. В-третьих, такой подход дает возможность контролировать соотношение экспрессии легкой и тяжелой цепей, что позволяет получать стабильно трансфецированные пулы со специфической продуктивностью более 5 пг/клетка/день (pcd) и титрами более 150 мг антитела на литр культуральной жидкости [146, 147]. Отмечено, что 5% клональных линий из таких пулов обладают удельной продуктивностью более 20 pcd и экспрессируют от 300 и более 500 мг/л антитела за короткий цикл продукции (batch). Таким образом, использование мультицистронных векторов представляет собой привлекательную альтернативу общепринятым подходам для быстрой экспрессии антител в культуре клеток СНО с высокой производительностью [146, 147].

Следует отметить, что мультипромоторные и мультицистронные конструкции достаточно громоздки, и, следовательно, трансфекция, например, в случае использования липофильного агента, будет затруднена из-за размеров вектора, поэтому классический метод экспрессии моноклональных антител в клетках СНО, трансфецированных комбинацией двух плазмид, несущих в отдельности легкую и тяжелую цепи антитела, широко используется и имеет огромный положительный опыт применения, по литературным данным, а также является гарантией получения высокопроизводительных продуцентов, получаемых в DHFR-системе амплификации [126-129].

Следующим, не менее ответственным этапом получения высокопроизводительного клона-продуцента является выбор метода трансфекции [127, 128]. Сегодня существует огромное разнообразие агентов и подходов для осуществления стабильной трансфекции, позволяющих реализацию введения чужеродной ДНК в клетки-хозяина с эффективностью не менее 80%. Каждый подход, естественно, имеет свои преимущества и ограничения по отношению к масштабу, эффективности и стоимости.

Однако, до сих пор наиболее распространенным методом недорогой, достаточно эффективной и более щадящей для культуры клеток-хозяина трансфекцией является использование катионного липидного реагента Lipofectamine. Его частицы состоят из положительно заряженной «головки», с помощью которой идет взаимодействие с фосфатными группами нуклеиновых кислот, и двух гидрофобных «хвостов», обеспечивающих прохождение ДНК/РНК через клеточную мембрану по принципу эндоцитоза.

Современные разработки в данной области позволили создать нуклеофекторы, которые предоставляют возможность доставлять векторы непосредственно в ядро клетки, а также высокоэффективные системы электропорации, ярким примером которой сегодня является Neon (Life Technologies, США), обеспечивающая быструю и эффективную доставку нуклеиновых кислот во все типы клеток млекопитающих [149].

После успешной реализации трансфекции экспрессионным вектором культуры клеток-хозяина важно уделить внимание тщательному и трудоемкому процессу селекции клонов и, в случае необходимости, амплификации гена интереса в целях увеличения производительности будущей клеточной линии. Методом ИФА или с помощью автоматизированных систем, например, OctetSystem (Pall, США), осуществляют масштабные скрининги клонов по показателям удельной продуктивности, а также ростовым характеристикам, выбирают лидирующие клоны, которые затем масштабируют и исследуют на стабильность и способность к росту при длительном культивировании. На этом этапе важно понимать, что по мере увеличения пассажа культуры клеток отмечается снижение объемной и удельной продуктивности некоторых клеточных линий в связи с ускорением роста, из-за потери производительности [149, 158]. Такие клеточные линии являются нестабильными и непригодными для крупномасштабного производства. Кроме того, клеточные линии с хорошей жизнеспособностью и скоростью роста, но имеющие склонность к агрегированию и обладающие высокой скоростью синтеза лактата, также

непригодны в целях масштабного биофармацевтического производства. Зачастую ограниченный период времени, предоставленный на этап создания клеточной линии, а так же зависимость качества продукта, метаболического профиля, производительности от типа клетки-хозяина становятся серьёзными проблемами на начальном этапе разработки всей технологии.

2.5 Основные аспекты оптимизации технологии культивирования

Основными направлениями оптимизации технологии культивирования являются: увеличение продуктивности по целевому белку, повышение выживаемости клеток, моделирование посттрансляционных модификаций. И успехов в том или ином направлении можно добиться разными способами.

Среди основных параметров процесса культивирования выделяют три группы: физические (температура, потребление газов, скорость и тип перемешивания), химические (величина pH, уровень растворенного кислорода, осмоляльность среды, уровень растворенного кислорода и углекислого газа, метаболиты, окислительно-восстановительный потенциал) и биологические (концентрация клеток, жизнеспособность, уровень лактатдегидрогеназы, митохондриальная активность, анализ клеточного цикла). Даже незначительные отклонения одного из параметров от оптимальных значений могут вызывать стресс для культуры клеток [159, 160], что влечет за собой ухудшение ростовых характеристик, снижение производительности продуцента, а, в конечном счете, потерю качества экспрессируемого продукта.

На рисунке 10 [108] представлена типичная схема, иллюстрирующая взаимосвязь основных параметров культивирования в системе биореактора с мешалкой, оснащенного датчиками контроля температуры, давления, pH и растворенного кислорода.

Понимание взаимосвязи параметров процесса и их влияния на культивирование культуры клеток является важным требованием для

успешной реализации технологии с целью повышения эффективности процесса.

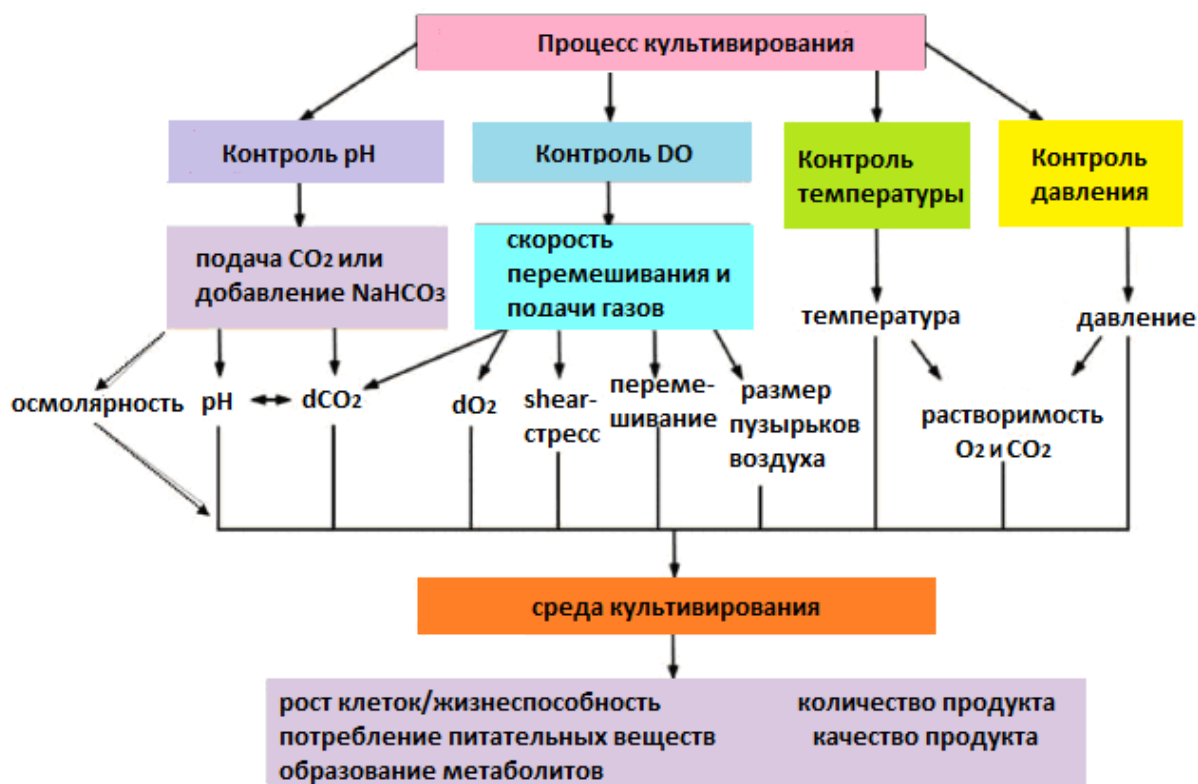


Рисунок 10 – Взаимосвязь основных параметров культивирования в системе биореактора с мешалкой, оснащенного датчиками контроля температуры, давления, pH и растворенного кислорода

2.5.1 Температура культивирования

Метод оптимизации процесса, основанный на понижении температуры среды в процессе культивирования, довольно часто используется в биотехнологии [158-171]. Температура является критическим параметром процесса культивирования и оказывает прямое влияние на скорость роста культуры клеток, метаболизм и уровень экспрессии целевого белка.

Для культивирования клеток СНО оптимальной считается физиологическая температура 37-38° С, обеспечивающая максимальную скорость пролиферации [160-166]. Было показано, в случае превышения

этого уровня температуры возникает вероятность губительных для клеток последствий – например, индукции синтеза белков теплового шока и запуска каскада реакций, приводящих к апоптозу и деградации клеточной культуры. Однако, понижение температуры с 37 до 28-34° С замедляет рост клеток и их метаболизм [162]. Этот способ описан в литературе, как эффективный подход для увеличения количества продукта. В начале процесса инокулят засевают при температуре 37° и, не меняя её, наращивают клеточную культуру до определённой плотности, достаточной для эффективной продукции целевого белка, а затем понижают температуру на время производства белка, что приводит к изменению скорости апоптоза и остановке клеточного цикла в фазе G1 [162-166]. Точная температура подбирается эмпирически для каждого клона-продуцента, причем продуцент должен быть к ней предварительно адаптирован [162]. За счет замедления клеточного цикла существенно снижается скорость роста биомассы, но повышается продолжительность культивирования (с 6-8 дней до 10-15 дней) из-за более долгого сохранения жизнеспособности клеток. Таким образом, суммарная продуктивность на единицу объема среды становится еще выше.

Наряду с вышесказанным было показано влияние снижения температуры во время культивирования на профиль гликозилирования [169, 170], агрегацию [171], а так же на количество заряженных изоформ [172, 173], обусловленных, например, увеличенным содержанием различных вариантов лизина, возможно, связанное с уменьшением уровня транскрипции карбоксипептидазы В.

2.5.2 Величина pH

Для продуцентов многих рекомбинантных белков, в частности, гликопротеинов, требуются как тщательная оптимизация, так и поддержание величины pH культуральной среды, так как этот параметр подвержен изменению не только за счет выделяемого углекислого газа в процессе жизнедеятельности клеточной культуры, но и за счет метаболизма лактата.

Уровень pH важен для сохранения ионного баланса, функционирования ферментных систем клетки, оптимального связывания гормонов и факторов роста с поверхностными рецепторами. От кислотности среды зависят не только продуктивность и выживаемость клеток, но и содержание изоформ, отличающихся степенью гликозилирования [162, 174].

Обычно понижение pH во время культивирования осуществляют путем подачи CO_2 через барботер или в пространство над поверхностью культуральной жидкости, а с целью повышения pH вытесняют CO_2 с помощью подачи других газов, например, воздуха или азота. Часто в таких случаях требуются слишком большие потоки подачи газов, что решается подачей 0,5 М раствора бикарбоната натрия. Это увеличивает риск необратимого изменения осмолярности. Поэтому оптимизация и регуляция данного параметра играет одну из определяющих ролей в количестве и качестве получаемого продукта.

Важность поддержания pH среды для культивирования продуцентов гликопротеинов подтверждена литературными данными. Например, при сравнении разных условий культивирования клеточных линий, экспрессирующих эритропоэтин, было показано, что оптимальные продуктивность и скорость роста клеток достигаются при pH 6.8-7.0, а оптимальное гликозилирование – при pH 7.0-7.4 [162]. По-видимому, это связано с высокой активностью ферментов, отщепляющих гликаны и сиаловые кислоты, которые более активны в кислой среде. Было замечено, что при снижении pH на 0,2 снижается выработка лактата в 1,5-2 раза [162].

2.5.3 Концентрация растворенного кислорода

Очевидно, потребление кислорода постоянно растет в процессе культивирования. Отмечено, что в стационарной фазе оно может расти и при постоянной клеточной плотности. Так как обычно потребление кислорода растет быстрее, чем требуется увеличение скорости потока для контроля pH,

поддержание уровня растворенного кислорода и pH обеспечивают подачей смеси трех газов: азота, воздуха и кислорода (рис. 11).

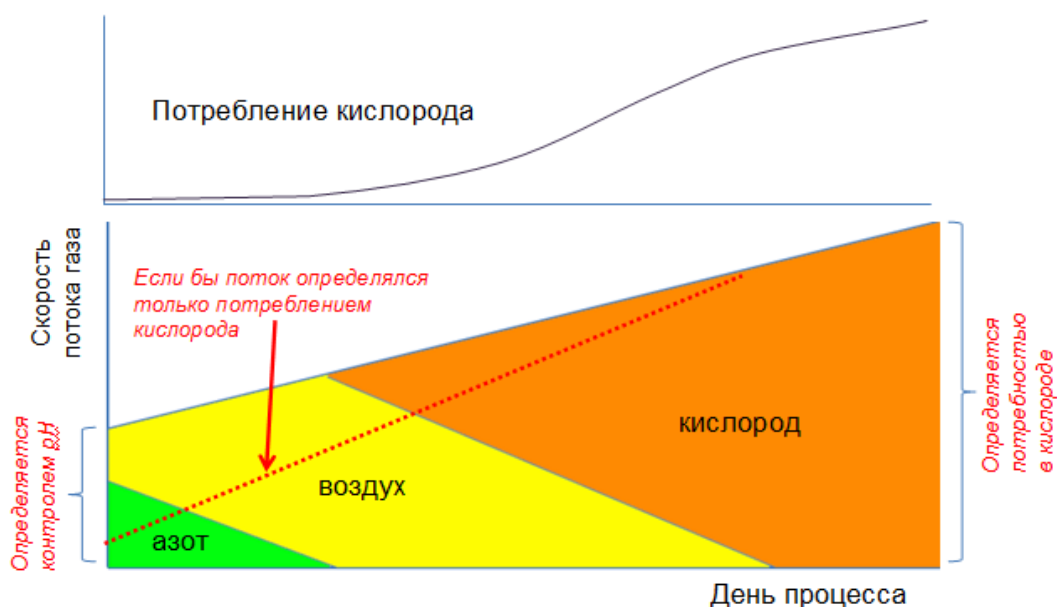


Рисунок 11 – Взаимосвязь pH и уровня растворенного кислорода

Клетки млекопитающих могут расти и функционировать в большом диапазоне концентраций растворенного кислорода в культуральной среде (от 20 до 100%) без существенного снижения продуктивности и жизнеспособности [161]. Вместе с тем показано, что при низких значениях содержания растворенного кислорода в культуральной среде менее 30%, несколько снижается продукция высокогликозилированных форм моноклональных антител [161, 162, 175]. При этом повышается уровень выработки лактата, что негативно сказывается и на общей продуктивности клеточной линии. При содержании кислорода в культуральной среде от 30 до 100% профиль гликозилирования производимых моноклональных антител одинаков. Кроме того, описано снижение продуктивности и жизнеспособности культуры клеток-продуцентов при повышении содержания растворенного кислорода в среде до 100 % [161, 162]. Таким образом, оптимальным для роста клеток и продукции целевого белка является поддержание концентрации растворенного кислорода на уровне от 30-50% и избегание низких и высоких значений данного параметра.

Отмечают, что кратковременное (менее 10 минут) снижение уровня растворенного кислорода ниже 20% или повышение выше 100% не оказывает негативного влияния на культуры клеток, однако, долговременный выход за пределы допустимого диапазона не допускается в принципе, так как это влечет за собой необратимые изменения в поведении культуры клеток, а так же качестве и количестве экспрессируемого продукта.

В этом разделе следует также отметить, что правильный выбор аппаратного оформления процесса, а именно типа мешалки и ее расположения (для реакторов с механическим перемешиванием), выбор подходящего типа датчика уровня растворенного кислорода и его размещения в системе биореактора, корректное определение скорости и типа перемешивания в зависимости от конкретной клеточной линии, в конечном счете определяют насколько равномерным является поток культуральной жидкости в биореакторе для поддержания корректного уровня растворенного кислорода в системе.

2.5.4 Осмолярность среды

Осмотическое давление является важным фактором, значение которого нужно контролировать во время культивирования клеток млекопитающих. Оно оказывает влияние на кинетику ферментативных реакций в клетках, и сказывается на клеточном росте и продуктивности. Различные клеточные линии имеют разную чувствительность к осмотическому давлению среды, наиболее оптимальными значениями осмолярности для большинства культивируемых клеток млекопитающих являются 260-320 мОсм $\times$ кг⁻¹ [161]. В процессе культивирования происходит накопление различных продуктов жизнедеятельности клеток (метаболитов), приводящее к увеличению осмотического давления, что негативно сказывается на росте клеток [175-177]. Однако опубликованы данные, что постепенное повышение осмотического давления в среде до значений 450-470 мОсм $\times$ кг⁻¹ не вызывает драматического снижения жизнеспособности клеток, а более того,

положительным образом сказывается на их продуктивности [161, 175-177]. Наряду с этим, было показано, что повышение осмолярности путем внесения в среду для культивирования хлорида натрия приводит к изменению профиля гликозилирования [178, 179].

Важным моментом служит влияние осмолярности среды на агрегацию рекомбинантных белков, производимых в больших количествах клетками-продуцентами [161]. Таким образом, повышение осмолярности среды является достаточно экономичным способом увеличения продуктивности процесса по целевому белку, хотя и оказывающим влияние на рост клеток, и при разработке технологии культивирования необходимо учитывать данный факт.

2.5.5 Концентрация растворенного углекислого газа

В результате жизнедеятельности культуры клеток млекопитающих в культуральной среде накапливается углекислый газ, источником которого также является бикарбонат натрия, подаваемый для регуляции pH. Известно, что он хорошо растворяется в воде, в отличие от кислорода и его накопление приводит к снижению pH. В связи с этим его следует постоянно отводить из культуральной среды, вытесняя другими газами, что становится серьёзной проблемой в случае крупномасштабного культивирования в биореакторах более 100 л.

В случае поддержания уровня растворенного углекислого газа решающим моментом является выбор способа подачи смеси газов, необходимых для жизнедеятельности культуры клеток [161, 174, 180, 188]. Например, поверхностная аэрация используется часто, как единственный способ подачи потоков газов любых скоростей, не травмируя клетки, однако, недостатком такого выбора является низкая эффективность [157, 174, 180] и подходит такой способ только для сосудов с большим отношением поверхности к объёму (в основном для волновых реакторов),

Основным эффективным способом подачи является барботирование мелкими пузырьками, рекомендуемое в случае культивирования в реакторах с механическим перемешиванием небольшого объема [157, 161, 174, 180, 181]. В этом случае не требуются большие потоки газов, однако, было показано, что мелкие пузырьки сильно травмируют клетки и углекислый газ выводится неэффективно из-за небольшой скорости потока, а в случае увеличения потока повышается риск сильного пенообразования. Барботирование с крупными пузырьками (отверстия 0,5-2 мм или открытая трубка) очень часто используется повсеместно для биореакторов с механическим перемешиванием небольшого объема для высокой эффективности выведения CO_2 и контроля pH, при этом культура клеток слабо подвержена стрессу (в зарубежной литературе встречается термин shear-stress) [180, 181]. Очевидно, что в случае крупномасштабного культивирования, такой вид барботирования имеет сравнительно низкую эффективность аэрации, что можно решить увеличением скоростей потоков.

2.5.6 Основные питательные вещества и метаболиты

Современные среды для суспензионных культур относятся к бессывороточным (не содержат белков животного происхождения) или безбелковым (белки заменены короткими пептидами) и химически определенным (состав среды строго соблюдается и не зависит от партии) [161]. Они содержат все необходимое для роста и поддержания нормальной жизнедеятельности клеток, при этом остается возможность дальнейшей оптимизации с помощью увеличения концентрации некоторых веществ. Базовыми компонентами среды служат глюкоза, аминокислоты, неорганические соли, витамины.

Глюкоза – важнейший компонент питательной среды, служащий основным источником энергии в клетке [182-188]. Оптимальная концентрация в культуре клеток – 0,5-1,0 г/л, но с непрерывной компенсацией потребления [188]. Глюкоза утилизируется клетками с

образованием молочной кислоты и ее солей – лактата, и ее солей – лактатов. Их накопление в культуральной среде повышает осмотическое давление выше допустимого [161, 182, 183]. Высокая концентрация глюкозы может вызвать увеличение выработки лактата и гликирование белков [161, 186]. Отсутствие глюкозы в среде для культивирования менее 4-6 часов неопасно для клеток и приводит к утилизации других сахаров, если таковые есть в среде, и/или потреблению лактата. Жизнеспособность большинства клеток млекопитающих резко снижается при истощении глюкозы в питательной среде. Следует отметить, что недостаток глюкозы более 12 часов вызывает апоптоз клеток [186-188].

Контроль содержания лактата в среде в процессе культивирования продуцента является важной задачей. Прямой токсичности для клеток млекопитающих в случае накопления высоких концентраций более 3 г/л в культуральной среде нет, но это вызывает снижение pH и повышение осмолярности, которые трудно компенсировать.

Существует два подхода к оптимизации содержания метаболитов, накапливающихся в среде по мере культивирования. Первый подход подразумевает поддержание концентрации глюкозы на минимальном уровне – 1-2 г/л, при котором не будет происходить повышенное образование лактатов [161, 182-184]. При другом подходе предлагается использовать альтернативные источники энергии и питания для клеток, например, галактозу [185, 186] и фруктозу [186]. Однако не все типы клеток способны усваивать данные сахара, кроме того, адаптация метаболизма клеток к новому источнику питания занимает определенное время. В связи с этим данный метод не получил широкого распространения.

Аминокислоты (АК), которые используются клетками в неизмененном виде, а также являются источником азота и углерода – не менее важные компоненты питательных сред. Исследование их потребления необходимо для каждой клеточной линии [161, 168]. Для определения лимитирующих АК проводится анализ кинетики утилизации всех двадцати АК в процессе

культивирования [186]. По результатам анализа подбирается оптимальный состав питательных сред и добавок для каждой конкретной клеточной линии. Чаще всего к лимитирующим АК для клеток СНО относятся аспарагин/глутамин/аспартат/глутамат, лейцин, аргинин, изолейцин, глицин; в меньшей степени валин, лизин, серин; в еще меньшей степени – триптофан, тирозин, треонин, метионин. Концентрации аспарагина/глутамин/аспартата/глутамата поддерживаются на уровне 1-2 г/л, других АК – на уровне 0,1-0,3 г/л [161].

Среди всех аминокислот наиболее важным для клеток млекопитающих является глутамин (его концентрация в коммерческих средах превышает концентрации остальных АК в 10 раз). Глутамин является главным источником азота, а также обеспечивает от 30 до 65% энергии, необходимой для клеточного роста. В результате метаболизма глутамин (и в меньшей степени аспарагин) образуются аммиак и соли аммония, обладающие ингибирующим действием на рост клеток и вызывающие изменение профиля гликозилирования продуцируемых белков. При рекомендуемых концентрациях глутамин в среде (1-2 г/л) концентрация аммиака достигает токсичных значений за несколько дней культивирования клеток в высокой плотности [187, 188]. Для культивирования глутамин может быть заменен на аспарагин или дипептиды (аланил-глутамин, глицил-глутамин) без особого вреда для клеток.

Для снижения негативного влияния аммиака на клетки, встраивается генетическая конструкция, содержащая помимо гена целевого белка ген глутамин-синтетазы [161, 186, 187]. При экспрессии данного фермента в клетках происходит биосинтез глутамин из глутамата и аммиака, таким образом, концентрация последнего в культуральной среде снижается. Еще одним подходом для уменьшения содержания аммиака является поддержание концентрации глутамин на более низком уровне за счёт периодического добавления в среду или контролируемого высвобождения из аланил-глутамин [161, 187].

Помимо базовых компонентов культуральные среды также содержат витамины, являющиеся кофакторами ферментов некоторых реакций метаболизма аминокислот и необходимые для функционирования некоторых белков. В процессах культивирования основную роль играют витамины группы В [161, 187]: тиамин (витамин В1), рибофлавин (витамин В2), никотиновая кислота (ниацин, тинамид, витамин В3), холин (витамин В4), пантотеновая кислота (витамин В5), пиридоксин (витамин В6), биотин (витамин В7), инозитол (витамин В8), фолиевая кислота (витамин В9), бензойная кислота (предшественник парааминобензойной кислоты, витамина В10), цианокобаламин (витамин В12). Некоторые из них утилизируются в процессе культивирования (фолиевая кислота, холин), другие требуют однократного добавления в питательную среду.

2.5.7 Добавки, влияющие на продуктивность

В условиях наработки больших количеств целевого рекомбинантного белка, являющегося чужеродным для клетки, помимо базовых компонентов, в среду необходимо вносить некоторые добавки разной природы, существенно увеличивающие выживаемость и уровень продуктивности [161]. В условиях сверхплотного культивирования, достигаемого при росте суспензионных клеток в биореакторах в бессывороточных средах, происходит истощение культуральной среды по питательным веществам, приводящее к снижению скорости клеточного роста, а, впоследствии, массовой гибели клеток. В таких условиях происходит активация гликозидаз, высвобождаемых из погибших клеток, что негативно сказывается на статусе гликозилирования продуцируемого белка [161, 189]. Поскольку для многих производимых рекомбинантных белков степень гликозилирования является критическим параметром, необходимо поддерживать высокую жизнеспособность клеток в течение всего цикла продукции. Для этой цели используются специально вводимые подпитки и добавки.

Химические реагенты, добавляемые в культуральную среду, можно условно разделить на две группы. К первой относятся вещества, повышающие скорость пролиферации и выживаемость клеток, такие как факторы роста (инсулин, трансферрин, лактоферрин), антиоксиданты, осмопротекторы, питательные вещества (глюкоза, витамины, аминокислоты, рекомбинантный альбумин). Ко второй группе относятся вещества, повышающие экспрессию нужного белка и его стабильность, сохраняющие правильную конформацию, моделирующие посттрансляционные модификации (ингибиторы деацетилаз гистонов, детергенты, соли, рекомбинантные белки и пептиды, другие стабилизаторы, предшественники сахаров). В таблице 1 [161] приведены вещества, добавление которых, по литературным данным, стимулирует клеточный рост, повышает продуктивность клеточных линий, улучшает спектр посттрансляционных модификаций.

Среди добавок, позволяющих существенно улучшить экспрессию целевого рекомбинантного белка, хорошо известны бутират натрия, пропионовая и вальпроевая кислоты как сильные активаторы транскрипции. Эти вещества изменяют структуру хроматина путем ингибирования фермента гистондеацетилазы (HDAC), способствуя гиперацетилированию гистонов, улучшая тем самым транскрипцию гена целевого белка [161, 191, 192]. Несмотря на то, что использование этих ингибиторов может вызвать нежелательные вторичные эффекты, такие как блокирование клеточного цикла или индукция апоптоза [193, 195], их добавление позволило добиться повышения продуктивности в многочисленных исследованиях в клетках СНО [191, 192, 196, 197], особенно, в комбинации с понижением температуры на стадии культивирования [196, 197]

Таблица 1 – Вещества, добавление которых способствует улучшению выживаемости клеток, уровня продукции и посттрансляционных модификаций рекомбинантных белков

Класс соединений	Вещество	Эффективная концентрация	Механизм действия
1	2	3	4
липиды	холестерин	10-20 мг/л	предшественники витаминов и долихола
	жирные кислоты	40-60 мг/л	
сахара	галактоза	10-50 мМ	повышает долю полностью галактозилированных форм гликанов
	глюкозамина гидрохлорид	5-20 мМ	предшественники сиаловых кислот, улучшают профиль гликозилирования
	N-ацетил-D-маннозамин	5-20 мМ	
нуклеотиды	уридин	1-2 мМ	носители цепочек сахаров при биосинтезе
	цитидин	1-2 мМ	
	аденозинмоно-фосфат	2-4 мМ	повышает экспрессию
ингибиторы	2,3-дегидро-2-дезоксиглюкозамина N-ацетилнейраминановая кислота	10-20 мкМ	ингибирует сиалидазы, улучшает профиль гликозилирования
	бутират натрия	1-8 мМ	повышают экспрессию за счет ингибирования деацетилаз гистонов
	пропионовая кислота	1-8 мМ	
	пентановая кислота	1-8 мМ	
неорганические соли	натрия хлорид	20-40 мМ	увеличивает растворимость белков и снижает адгезию клеток
	соли марганца	1-10 мкМ	служат кофакторами ферментов гликозилирования
осмотпротекторы	бетаин, глицин-бетаин	10-20 мМ	защищают клетки от перепадов осмотического давления в бессывороточной среде
антиоксидан-ты	восстановлен-ный глутатион	0,6-0,8 мг/л	протекторы от окислительного стресса, улучшают спектр посттрансляционных модификаций
	N-ацетилцис-теин	0,5-1 мМ	
	липоевая и дигидролипоевая кислота	80-120 мкМ	
	бензоат натрия	5-10 мМ	связывает свободные радикалы
поверхностно-активные вещества	твин-20	0,1-0,2 %	уменьшают агрегацию клеток, стабилизируют белковые молекулы
	твин-80	0,1-0,2 %	
	плуроник F68	0,01-0,1 %	
	сульфат декстрана	30-60 мкг/мл	
стабилизаторы	глицерин	1-2 %	стабилизирует молекулы белков путем уменьшения межмолекулярной агрегации, повышает гликозилирование
	ДМСО	0,1-1 %	увеличивает экспрессию, улучшает профиль гликозилирования, стабилизирует белки

Эффекты, оказываемые на клеточный рост и метаболизм указанными выше химическими агентами, продолжают изучаться, и токсичность накладывает определенные ограничения на их использование в производстве рекомбинантных белков медицинского назначения. Альтернативой в данном случае могут служить гомологичные соединения – пропионат натрия, пентановая или бутановая кислоты. Показано также преимущество вальпроевой кислоты по сравнению с бутиратом натрия.

Данные соединения позволяли значительно улучшить экспрессию целевого белка, однако, при этом не оказывали ингибирующего действия на рост клеток [161, 198, 199-202]. Например, в работе Парка [203] с соавторами были проведены исследования влияния куркумина, курецина, DL-сульфорафана, тимидина, валериановой кислоты, фенилбутирата, вальпроевой кислоты и хлорида лития на ростовые характеристики и продуктивность клеточных линий на основе СНО. Было показано, что валериановая кислота является эффективной альтернативой для улучшения экспрессии целевого белка.

Диметилсульфоксид (ДМСО) и глицерин также нередко используются в качестве добавок в культуральную среду. Оба соединения являются химическими шаперонами: они способны стабилизировать нативную конформацию белков, влияя на фолдинг молекул [161, 204]. Существуют данные, что ДМСО регулирует продукцию рекомбинантного белка на генном, белковом и клеточном уровне. Показано, что ДМСО блокировал клеточный цикл, ингибируя рост клеток и предотвращая апоптоз [205]. Обладая полярной природой, данный растворитель способен нарушать целостность цитоплазматической мембраны, что облегчает секрецию производимых белков, не влияя при этом на жизнеспособность клеток [206]. По данным авторов, добавление ДМСО в среду до концентрации 0,2-1% позволило значительно повысить продукцию моноклональных антител и других рекомбинантных белков клетками СНО [206, 207]. Глицерин также применяется в биотехнологическом производстве в качестве белкового

стабилизатора, способствующего правильному фолдингу белковой молекулы, и усилителя экспрессии [208, 209].

Помимо веществ, влияющих на экспрессию целевого рекомбинантного белка, существует ряд добавок, позволяющих улучшить его качество, а также повысить жизнеспособность клеток за счёт снижения окислительного стресса. Так, для нейтрализации радикалов, образующихся в культуральной среде, используют антиоксиданты (N-ацетилцистеин, липоевая кислота, восстановленный глутатион, витамин С и др.) [161]. Важными компонентами среды также являются поверхностно-активные вещества и осмопротекторы (защищают клетки от перепадов осмотического давления, уменьшают их агрегацию).

Добавление пиримидиновых нуклеозидов также может увеличить рост клеток CHO, без значительного изменения удельной скорости производства. В результате увеличенного роста клеток концентрацию антител удается повысить до 9 г/л в течение 16 дней культивирования. Аналогичные эффекты применения нуклеозидов наблюдались в культурах с периодической загрузкой линии клеток CHO, экспрессирующей Fab-фрагмент, где конечная концентрация фрагмента Fab составляла более 4 г/л [210]. Торкшванд в своей работе с соавторами описал реализацию модели Plackett-Burman для скрининга аминокислот в качестве добавок, влияющих на стимуляцию роста и продуктивность линии клеток CHO-DG44, продуцирующей мАТ бевацизумаб. Благодаря этой стратегии конечный титр моноклональных антител был увеличен на 70% по сравнению с контрольной группой. Было показано, что аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аргинин и глицин оказывали наибольшее положительное влияние на конечный титр антител. Наряду с экспериментами по увеличению уровня экспрессии изучалось также влияние аминокислот на некоторые критические качественные характеристики антител [211].

2.5.8 Добавки, влияющие на гликозилирование

Не менее важным направлением является оптимизация состава среды, направленная на улучшение профиля гликозилирования целевого белка. Практически все современные терапевтические моноклональные антитела, как и их природные аналоги, являются гликопротеинами [212], и большинство из них имеют один сайт N-связанного гликозилирования в константной области тяжелой цепи [213]. Благодаря своему расположению, гликаны не влияют на связывание с антигенами, но являются одним из основных факторов, определяющих эффекторные функции антител [214]. В частности, отсутствие остатка фукозы вызывает многократное усиление опосредованной антителом клеточной цитотоксичности (ADCC) за счет лучшего связывания с рецептором FcγRIIIA [215], присутствие концевых остатков галактозы – увеличение аффинности к белку C1q системы комплемента [216] и повышение эффективности комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) [217]. Интересным свойством антител с концевыми остатками галактозы и сиаловых кислот является их противовоспалительное действие [218, 219]. Наконец, гликаны с высоким содержанием маннозы обеспечивают более быстрый клиренс антител из организма, что является негативным фактором [220].

Все N-связанные гликаны мАТ двухантенные, но при этом имеют высокую гетерогенность структуры. Они подразделяются на маннозные, комплексные и гибридные, в зависимости от моносахаридов, входящих в их состав (рис. 12) [212].

Важно отметить, что оптимальное гликозилирование должно реализовываться на стадии культивирования, поскольку гликоформы антител мало отличаются по своим характеристикам, и их разделение на этапе очистки представляет нетривиальную задачу.

Для оптимизации профиля гликозилирования существует ряд подходов: добавление в культуральную жидкость субстратов реакций гликозилирования (сахаров, нуклеозидов, жирных кислот и т.д.); ингибирование ферментов, удаляющих гликаны с остатков аспарагина

полипептидной цепи; подбор параметров культивирования (продолжительности, температуры, pH, содержания растворенного кислорода) как было описано ранее.

Известно, что непосредственные субстраты в реакциях гликозилирования состоят из одного остатка сахара и одного нуклеозида, таким образом, оба класса этих соединений необходимы для корректного протекания процесса [161, 121]. В реакциях также участвуют липид долихол и его производные фосфо- и дифосфодолихол, являющиеся носителями синтезируемой углеводной цепи [221].

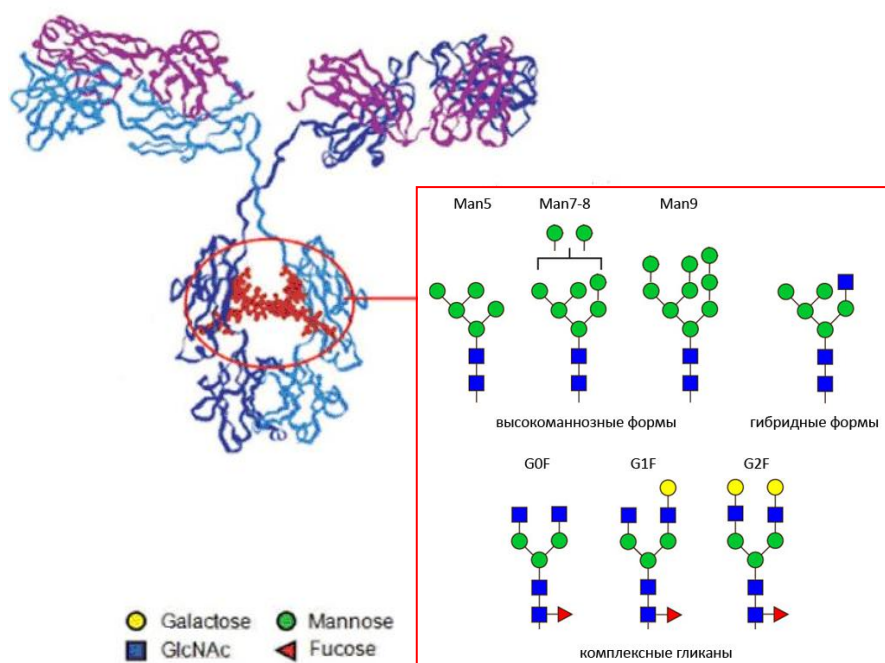


Рисунок 12 – Структура основных гликозилированных форм антител

Исходя из этого, добавление некоторых веществ в КЖ позволяет существенно улучшить степень гликозилирования белка. Среди сахаров важными являются глюкоза, галактоза, манноза, N-ацетилманнозамин и глюкозамин [161, 222]. Последние важны, поскольку присутствуют в клетке в недостаточном количестве для гликозилирования сверхэксперссируемого экзогенного белка. Кроме сахаров положительное действие на профиль гликозилирования оказывают нуклеозиды (расходятся в реакциях

гликозилирования в эквимоллярных концентрациях с сахарами), жирные кислоты (как предшественники долихола и витаминов) и соли марганца (кофактора многих ферментов гликозилирования) [161, 223]. Показано также, что некоторые вещества, обычно используемые для улучшения общего выхода белка, такие как глицерин и бутират натрия, оказывают положительное влияние и на его профиль гликозилирования [161, 261]. Возможно, такое действие связано с повышением экспрессии или активности ферментов гликозилирования.

Еще одной возможностью влияния на профиль гликозилирования белка является снижение активности ферментов гликозидаз, которые попадают в КЖ из мертвых клеток [161]. Существует около 20 типов гликозидаз, наиболее изученной является сиалидаза, отщепляющая терминальные сиаловые кислоты. Единственный ингибитор этого фермента – 2,3-дегидро-2-дезоксид-N-ацетилнейраминаовая кислота – эффективен в достаточно высоких концентрациях, и его применение требует экспериментальной проверки в каждом конкретном случае.

Особым направлением в области оптимизации профиля гликозилирования является изучение способов влияния на долю маннозных гликанов антител на этапе культивирования. Наиболее классическим подходом является добавление в культуральную среду ингибиторов фермента альфа-маннозидазы I, выполняющей первый этап превращения маннозных гликанов в комплексные. Из них на настоящий момент представляет интерес только кифунензин, который эффективен на клеточных культурах и позволяет повысить долю маннозных гликанов без потери продуктивности [224, 225]. Следует отметить, что повышается содержание не столько гликана Man5, сколько гликанов с 8-9 остатками маннозы. Другие ингибиторы, такие как кастаноспермин, дезоксиноиримицин и их производные, ингибируют также глюкозидазы I и II, в результате чего маннозные гликаны после их использования содержат на концах остатки глюкозы. Решающими недостатками, затрудняющими использование

перечисленных ингибиторов в биотехнологии, является их токсичность и высокая стоимость.

В связи с этим в последние годы ведутся поиски недорогих и безопасных способов оптимизации состава маннозных гликанов. Например, таким способом может быть использование монензина – ионофорного антибиотика, механизм действия которого основан на встраивании в клеточную мембрану с последующим нарушением транспорта ионов натрия и водорода [226, 227]. Значение pH является критическим фактором для ферментативных реакций в клетках – так, снижение pH с 7,0 в секреторном отделе ЭПР до 6,0 в транс-Гольджи, достигаемое при увеличении транспорта протонов в просвет аппарата Гольджи, необходимо для корректного гликозилирования белков [228]. Добавление к клеткам монензина приводит к нейтрализации pH в Гольджи, что влияет на функционирование ряда гликозилирующих ферментов и, как было показано в ряде работ, приводит к повышенному образованию высокоманнозных гликоформ [229, 231]. Однако для минимизации токсических эффектов монензина на клетки требуется тщательный подбор эффективной концентрации и условий его добавления.

Изменения профиля гликозилирования рекомбинантных белков в сторону увеличения высокоманнозных форм достигали при добавлении в культуральную среду сахарозы и тагатозы [232], а также более редко встречающихся в природе сахаров – раффинозы, трегалозы, психозы, лактулозы и др. [233]. В одной из работ было показано повышение содержания доли высокоманнозных форм при замене 94% глюкозы в составе среды для культивирования на маннозу [234].

Повышение доли маннозных гликанов наблюдали и при других изменениях условий культивирования, например, при тонком контроле содержания глюкозы и глутамина на низком уровне [235] и повышении [236]. Однако данные способы имеют побочные эффекты в виде снижения продуктивности. Наконец, давно известно, что доля Man5 повышается на поздних днях культивирования, возможно, как раз из-за большей

осмоляльности среды [237], правда, неясна практическая ценность этого наблюдения.

Все перечисленные реагенты могут добавляться либо однократно, в начале культивирования, либо в виде подпитки, то есть многократно по мере истощения. Для некоторых веществ, например, сахаров и аминокислот, использование в виде подпиток предпочтительно, поскольку они быстро расходуются клетками, и требуется поддержание их постоянной концентрации в определенном диапазоне, выше которого они становятся токсичными для клеток [161]. Имеет большое значение не только состав подпиток, но и схема их добавления.

Обобщая имеющиеся данные по подпиткам и добавкам, вносимым в культуральную среду, можно сделать вывод, что с помощью экспериментального подбора соотношений концентраций описанных веществ можно добиться повышения допустимой клеточной плотности в 2-3 раза, выживаемости в 1,5-2 раза, уровня продукции – до 10 раз, а также повлиять на качественные характеристики белка [161]. Кроме того, многими биотехнологическими компаниями разработаны наборы реагентов для быстрой оптимизации состава сред, позволяющие снизить расходы и время оптимизации в десятки раз.

2.6 Режимы и аппаратное оформление процессов культивирования клеток СНО для производства мАТ

За последние 25 лет мировая биотехнология достигла больших результатов в области разработки и промышленного производства медицинских препаратов на основе рекомбинантных белков. Однако потребность рынка в новых биотехнологических препаратах для лечения тяжелых заболеваний продолжает неуклонно расти. В связи с вышесказанным особое внимание ученых, разработчиков и работников производств должно уделяться повышению эффективности процесса культивирования клеток млекопитающих, включающее увеличение продуктивности с сохранением высокого качества рекомбинантного белка.

Успехов в данном направлении можно достичь, применяя индивидуальный подход к каждой линии клеток-продуцентов, учитывающий подбор оптимальных физико-химических параметров, состава питательной среды, стратегии введения подпиток и добавок, а также типа используемого биореактора для масштабирования процесса.

В настоящее время вопросам совершенствования аппаратного оформления биотехнологических процессов придается большое значение. И особое внимание уделяется созданию эффективных технологических схем и производств на основе использования автоматизированных систем одноразового применения.

Это общепризнанный подход во всех сферах биофармацевтической промышленности. Исследователи прилагают совместные усилия для преодоления существующих ограничений (стандартизация, усовершенствование датчиков, разработка улучшенных решений для автоматизации выделения и очистки продукта при помощи оборудования одноразового применения в крупномасштабном производстве). Все элементы, контактирующие с продуктом, изготавливаются из таких полимерных материалов, как полиэтилен или поликарбонат, использование которых одобрено Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов. Производитель, как правило, стерилизует оборудование с помощью бета- или гамма-излучения, то есть оно поставляется в готовом к использованию виде. Масштаб применения SUS в биофармацевтической промышленности значительно возрос в последние 15 лет, в частности, для всех процессов обработки культур животных клеток, где есть необходимость в быстрой разработке и эффективном производстве малых и средних объемов продуктов, таких как лекарственные препараты на основе моноклональных антител, гормонов, ферментов и вакцин [239].

В связи с тем, что клетки млекопитающих имеют некоторые особенности, связанные с невысокой скоростью роста, большей

чувствительностью к механическим повреждениям и пузырькам воздуха, к биореакторам для их культивирования предъявляют особые требования по конструкционному исполнению, так как системы перемешивания и аэрации во время работы не должны создавать стрессовых условий для культуры [128] и в то же время обязаны эффективно обеспечивать равномерность распределения питательных веществ и газов. Поэтому для эффективного проведения процесса культивирования для каждой клеточной линии подбирают тип биореактора, рассчитывают скорость перемешивания для обеспечения эффективного массообмена и поддержания равномерного уровня аэрации. Чем больше объем биореактора, тем более сложные механизмы необходимо задействовать для насыщения среды кислородом. В биореакторах большого объема используются высокие скорости перемешивания, которые могут травмировать клетки и для снижения гидродинамических нагрузок могут быть использованы вещества-протекторы или специальные конструкции перемешивающих элементов.

В таблице 2 [239] приведен список имеющихся в продаже промышленных биореакторов одноразового применения в диапазоне от настольного оборудования до масштабов, измеряемых в кубических метрах. Данный список не является исчерпывающим. В нем не представлены автоматизированные мини-биореакторы одноразового применения для культивирования в масштабах миллилитров, такие как ambr15 и ambr250 (компания Sartorius Stedim Biotech, ранее называвшаяся TAP Systems), системы BioBLU 0.3 (компания Eppendorf), биореактор Pall Micro-24 (компания Pall Life Sciences), BioLector (компания mp2-labs), серия биореакторов H ZRP производства компании Zellwerk и мини-биореакторы MagDrive – компании PBS Biotech. Биореакторы одноразового применения, используемые в тканевой инженерии, также не включены в таблицу. Перечислены биореакторы различных производителей. Их можно сортировать по механизму подачи энергии, размеру, конструкционному материалу резервуара для культивирования, типу датчиков и контроллеров.

Оборудование подходит для получения как суспензионных культур, так и адгезионных клеток.

Таблица 2 – Перечень имеющихся в продаже оснащенных измерительной аппаратурой биореакторов одноразового применения (в масштабах литров)

Тип реактора	Название реактора	Рабочий объем, л	Успешно используется для культивирования	Компания- производитель
Механический привод, волновой принцип действия, культивирование в мешках	Appliflex	0,5-25	Культуры животных и растительных клеток, водорослей	Applicon
	Cell-tainer (20л, 200 л)	0,015-150	Микроорганизмы	Cell tainer Biotech
		0,015-200	Культуры животных клеток	
	CellTumbler (различные модели Systems 50)	0,5-10	Культуры животных клеток	Cercell
	SmartRocker Bioreactor	0,5-25	Культуры животных и растительных клеток	Finesse
	Wave Bioreactor System (System 20/50 System 500/1000)	0,2-500		GE Healthcare
	ReadyToProcess WAVE25	0,2-25		
	XuriCellbag (System W5 и W25)	0,2-25	Человеческие клетки (соматические и стволовые)	
	Allegro XRS 20	0,1-20	Культуры животных клеток, микроорганизмов и Т-лимфоциты	Pall Life Sciences
Биореаtop Biostat RM (System 20/50 и System 200)	0,1-100	Культуры животных и растительных клеток, и микроорганизмы	Sartorius Stedim Biotech	
Механический привод с перемешивающим элементом, жесткий реакционный сосуд из поликарбоната	Серии CellVessel 21 и 23	0,250-75	Культура животных клеток	Cercell
		0,25-1	Микроорганизмы	
	BactoVessel серия 25	2-75		
	Настольный реактор с мешалкой Celigen BLU (BioBLU 1c, 5c, 14c, 50c)	0,25-40	Культура животных и человеческих клеток (стволовые клетки)	Eppendorf
	Настольный реактор с мешалкой Celigen BLU (BioBLU 1f)	0,25-1,25	Микроорганизмы	
	DASGIP Parallel Bioreactor (BioBlock с BioBLU 1c)	0,25-1,25	Культура животных и человеческих клеток (стволовые клетки)	
	DASGIP Parallel Bioreactor (BioBlock с BioBLU 1f)		Микроорганизмы	
	Биореактор Mobius CellReady 3л	1-2,4	Культура животных и человеческих клеток (стволовые клетки)	Merck Millipore
	UniVessel SU	0,6-2	Культура животных и растительных клеток,	Sartorius Stedim Biotech

Тип реактора	Название реактора	Рабочий объем, л	Успешно используется для культивирования	Компания-производитель
			человеческие клетки (стволовые клетки) и микроорганизмы	
	Биореактор одноразового применения SmartVessel3	0,5-2,2	Культуры животных и растительных клеток	Finesse
Механический привод с перемешивающим элементом, культивирование в мешках	Xcellerex XDR (10 л, 50 л, 200 л, 500 л, 1000 л, 2000 л)	4,5-2000	Культуры животных клеток	Продолжение Таблицы 2 GE Healthcare
	Xcellerex XDR-50 MO Fermenter	10-50	Микроорганизмы	
	Mobius CellReady (50 л, 200 л, 1000 л, 2000 л)	10-2000	Культура клеток животных	Merc Millipore
	Allegro STR (200 л, 1000 л, 2000 л)	60-2000		Pall Life Sciences
	PadReactor (25 л, 50 л, 125 л, 250 л, 600л, 1200 л)	8-960		
	BIOSTAT STR (50 л, 200л, 500л, 1000л, 2000 л)	12,5-2000	Культура животных, человеческих клеток (стволовые клетки) и микроорганизмы	Sartorius Stedim Biotech
	HyPerforma S.U.B. (50 л, 100 л., 250 л., 500 л., 1000 л., 2000 л)	25-2000	Культура животных и растительных клеток	ThermoScientific
	HyPerforma S.U.F. (50 л, 100 л., 250 л., 500 л., 1000 л., 2000 л)		Микроорганизмы	
Механический привод, орбитальное встряхивание	Биореактор OrbShake (SB10X, SB-50X, SB-200X, SB-2500X)	1-2500	Культуры животных, растительных клеток, микроорганизмы	Adolf Kuhner
	Current Bioreactor (5 л, 50 л, 150 л, 300 л)	0,5-30	Культуры животных клеток	Hangzhou Amprotein Bioengineering
Механический привод, вращение	Биореактор Vertical Wheel MagDrive (PBS3MAG, PBS15MAG)	1,8-15	Культура человеческих клеток (стволовые клетки)	PBS Biotech
Пневматический привод	CellMaker Felix3	1-50	Культура животных клеток	Cellexus
	CellMaker Regular и CellMaker Plus (8 л, 50 л)	1-50	Микроорганизмы и водоросли	
	Биореактор Vertical Wheel AirDrive (PBS 3 Air, PBS 15 Air, PBS 80 Air, PBS 500 Air)	0,6-500	Культуры животных клеток	PBS Biotech

Слудет отметить, что волновые биореакторы с одноразовыми мешками являются оптимальным решением для клеток, чувствительных к

механическому перемешиванию [114]. В этом случае культивирование клеточной суспензии проводится в мягких мешках со средой, которые помещаются на качающуюся платформу, что создаёт волновое движение жидкости внутри мешка [115, 116]. За счет волн осуществляется перемешивание среды и увеличивается площадь поверхности газообмена, при этом практически не создаются гидродинамические нагрузки, повреждающие клетки.

Таким образом, для культивирования небольших объемов клеточной суспензии данный тип биореакторов подходит лучше всего. При увеличении объема среды выше 200 л он начинает проигрывать реакторам с механическими мешалками за счет менее эффективной аэрации. Тем не менее использование одноразовых мешков позволяет сократить время обслуживания биореактора, снизить требования к квалификации персонала, упростить валидацию процесса [117].

Последней новинкой в области масштабирования процессов культивирования клеток млекопитающих и коммерческого биотехнологического производства в качестве эффективной альтернативы биореакторов с волновым и механическим перемешиванием является модель орбитального типа с применением одноразовых мешков [240]. Орбитальные биореакторы обладают меньшим механическим стрессом для клеток и крайне высокими скоростями переноса кислорода, тогда как технически консервативный подход позволяет сохранять и воспроизводить необходимые гидродинамические показатели от рабочих объемов в несколько десятков микролитров до 2500 литров. Масштабирование становится быстрее и проще, и позволяет реализовать процесс экономичнее по сравнению с традиционными биореакторами.

Сравнивая экономическую целесообразность использования одноразовых биореакторов, невозможно сделать однозначных выводов. С одной стороны, они требуют больших затрат на приобретение расходных материалов и производят большой объем отходов, с другой – для них требуются меньшие капитальные вложения и затраты на поддержание чистоты в помещении, у них практически отсутствует производственный брак, связанный с микробиологическим и перекрёстным загрязнением [119, 120-122, 239, 240]. Поэтому в настоящее время для

новых производств все чаще рекомендуется использовать для культивирования практически любых линий на основе клеток млекопитающих одноразовые биореакторы [123-126].

Что касается выбора режима культивирования, то сегодня предпочтения отдают двум основным типам организации процесса: длительному культивированию в замкнутом объеме с периодическим добавлением подпитки (fed-batch) и непрерывному (continuous), то есть перфузии, с задержанием биомассы или без, при котором субстрат или другие необходимые вещества вносят порциями или непрерывно [101-107].

Процессы культивирования в режиме fed-batch являются наиболее распространенными в настоящее время и эксплуатируются в масштабах рабочего объема до 20 000 л [101, 102, 117]. Данный тип технологии позволяет повысить эффективность процесса без значительного увеличения энерго- и трудозатрат. Культивирование в замкнутом объеме с подпитками предполагает добавление в среду питательных веществ, которые в первую очередь необходимы клеткам для поддержания жизнеспособности и продуктивности на высоком уровне (рис. 13 А, [118]). Чаще всего это глюкоза и аминокислоты, причём для различных клеточных линий соотношение данных компонентов может существенно различаться. Набор компонентов и режим добавления подпитки подбирается экспериментальным путём для каждой клеточной линии. Важно отметить, что, поскольку отвод токсичных метаболитов не проводится, то в подпитке следует поддерживать концентрацию питательных веществ на сравнительно низком уровне, обеспечивающем при этом эффективный рост клеток.

Типичные профили кривой роста, потребления глюкозы, а также накопления продукта в культуральной жидкости, характерные для периодического культивирования с подпиткой изображены на рисунке 14 [157], где можно видеть, что после лаг-фазы наблюдается максимальная скорость роста, затем рост прекращается либо из-за недостатка источников питания, либо из-за накопления ингибирующих продуктов, либо из-за некоторых изменений в физических свойствах среды.

После того как биомасса достигает максимума, наступает стационарная фаза, в которой количество биомассы остается постоянным. При снижении жизнеспособности культивирование останавливают и полученную культуральную жидкость центрифугируют или фильтруют для выделения наработанного продукта. В среднем процессы в таком режиме длятся около двух недель.

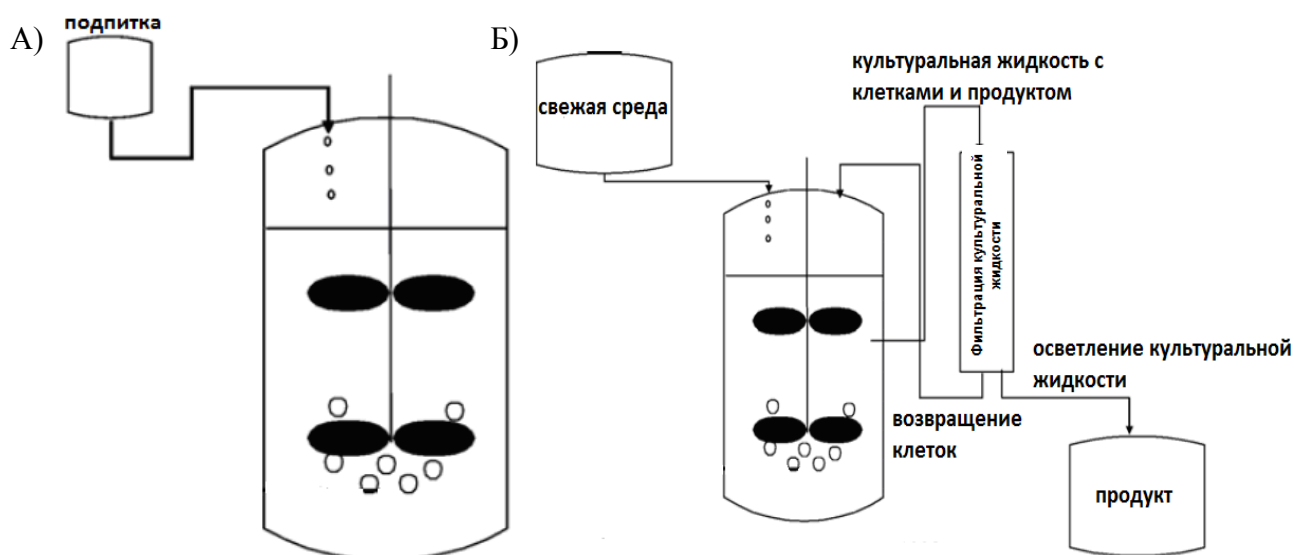


Рисунок 13 – Схематичное представление системы процессов культивирования

А) длительное культивирование в замкнутом объеме с периодическим добавлением подпитки (fed-batch); Б) непрерывное (continuous) культивирование, или перфузия, подразумевающая использование специальной системы фильтрации, которая позволяет постоянно отводить культуральную жидкость с продуктом без клеток

При непрерывном культивировании (рис. 13 Б, [118]) продукты метаболизма, ингибирующие рост – лактат, аммоний, удаляют, добавляя компенсирующий объем свежей среды, чтобы избежать недостатка субстрата для роста. Это дает возможность поддерживать стабильные условия культивирования (рис. 15, [157]), тем самым позволяет увеличить в несколько раз длительность процесса и, соответственно, количество продукта. Культивирование клеток в режиме перфузии позволяет получить очень высокую плотность жизнеспособных клеток от 60 до 350 млн клеток/мл за 30-60 дней.

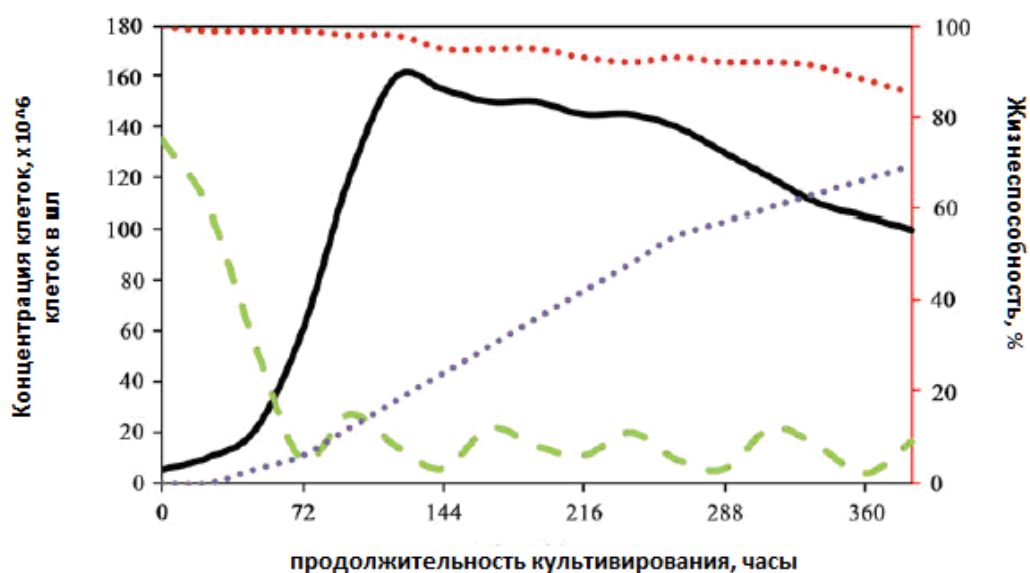


Рисунок 14 – Кривая роста и профили потребления глюкозы и падения жизнеспособности характерные для периодического культивирования с подпиткой

Прерывистая красная линия характеризует профиль жизнеспособности в процентах, прерывистая зеленая линия – профиль потребления глюкозы при периодическом добавлении глюкозы, фиолетовая прерывистая линия – концентрацию продукта.

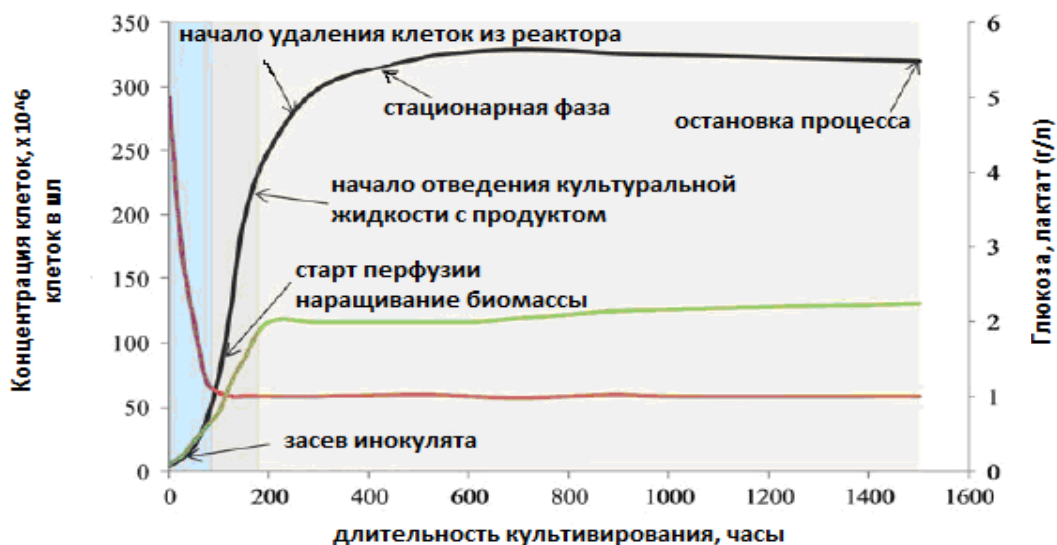


Рисунок 15 – Кривая роста и профили потребления глюкозы характерные для периодического культивирования с подпиткой (черная линия характеризует кривую роста, зеленая линия – накопление продукта, красная - концентрацию глюкозы)

Одним из ярких примеров успешно реализуемых технологий такого рода в биофармацевтической промышленности для культивирования клеток

СНО, является система фильтрации ATF System (Bioengineering AG, Швейцария) [106, 107], позволяющая существенно упростить различные стадии биотехнологических процессов, сокращая финансовые и временные затраты в ходе производства.. Принцип действия этой системы заключается в следующем: поток жидкости из биореактора проходит через фильтр в двух направлениях за счет движения диафрагменного насоса. При движении фильтруемой среды вниз происходит непосредственно фильтрация, при движении вверх фильтры промываются этой же средой. При этом отфильтрованный раствор выходит через специальный слив, в неотфильтрованный – возвращается в реактор, создавая при этом дополнительное перемешивание.

Несмотря на то, что преимуществ перфузии по сравнению с обычным культивированием с подпиткой достаточно много, существует ряд проблем, согласно которым ориентируются на выбор режима культивирования между перфузией и периодическим культивированием в пользу fed-batch. Безусловно, перфузия предоставляет возможность получить больше материала за более короткий период времени и является выигрышным вариантом в случае культивирования низкопродуктивной линии клеток для производства достаточного количества материала за короткое время. Но культивирование в режиме fed-batch, очевидно, является более простым и щадящим наряду с меньшими затратами на сырье и на финансовые потери, связанных с риском контаминации и другими сбоями. Кроме того, режим перфузии предпочтителен в первую очередь для продукции нестабильных молекул или токсичных по отношению к клетке-хозяина.

В связи с этим, например, для производства моноклональных антител, которые являются стабильными молекулами, предпочтение отдают культивированию в режиме fed-batch благодаря более простой и сравнительно недорогой разработке.

III. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основная часть работ выполнена в период с 2013 по 2018 год на базе департамента экспериментального производства ООО «Фармапарк».

3.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Создание экспрессионных конструкций. Экспрессионные конструкции получали на основе векторов pOptiVecТОРО и pcDNA3.3ТОРО (Gibco, USA). Синтетические последовательности кДНК генов тяжелой и легкой цепи мАТ адалимумаб (pUC57 HC-Adalimumab и pUC57 LC-adalimumab) с оптимизированным кодонным составом для клеток CHO были заказаны в фирме «Сервис-ген» (Санкт-Петербург).

Плазмидные вектора pOptiVEC-ТОРО и pcDNA3.3-ТОРО модифицировали посредством переноса фрагментов ДНК, кодирующих гены тяжелой и легкой цепи антитела, из векторов-доноров (pUC57 HC-adalimumab и pUC57 LC-adalimumab). Для этого обрабатывали векторы рестриктазами BamHI, XbaI, AgeI («Fermentas», Литва) и проводили разделение фрагментов ДНК методом электрофореза в 1.0%-ном агарозном геле с использованием прибора Sub-Cell GT System (Bio-Rad, США). Для элюции фрагментов ДНК из агарозного геля использовали набор QIAquick spin columns Kit (Qiagen, США). Затем полученные фрагменты лигировали ДНК-лигазой T4 («Ферментас», Литва) с целью получения экспрессионных конструкций:

- pcDNA-LC adalimumab;
- pOptiVec-HC adalimumab;
- pOptiVec-LC adalimumab;
- pcDNA-HC adalimumab.

Плазмидные ДНК для трансфекции нарабатывали в клетках *Escherichia coli* штамм XL1 (Invitrogen, США), трансформированных экспрессионными конструкциями методом электропорации с использованием модульной системы Gene Pulser Xcell (Biorad, США).

Для трансфекции клеток CHO выделяли особо чистую (“transfection grade”) плазмидную ДНК (предварительно линейаризованную) с помощью набора EndoFree Plasmid MaxiKit («Qiagen», США) по протоколу фирмы производителя.

Размораживание культуры клеток CHO-DG44 (Invitrogen, США).

Содержимое криопробирки с суспензией клеток в течение 1-2 мин размораживали на водяной бане TW-2 (Elmi, Латвия) при 37 °С, затем переносили в предварительно подогретую среду CD DG-44 (Life technologies, USA) и центрифугировали при 200g в течение 5 мин при комнатной температуре на центрифуге Allegra 25R (Beckman, Германия). Супернатант удаляли, осадок суспендировали в полной питательной среде, содержащей 8 mM аланил-глутамин (Invitrogen, США) и 0,18% Pluronic F68 (Sigma, США), затем переносили в культуральный флакон T25 (Corning, США). Культивирование осуществляли в стационарном CO₂-инкубаторе MCO-18M (Sanyo, Япония) в атмосфере 5%-ного CO₂ при температуре 37 °С и относительной влажности 95%.

Размораживание культуры клеток CHO-S. Проводили аналогичным образом, используя среду для культивирования Power CHO-2 (Lonza, США) с добавлением 8 mM аланил-глутамин (Invitrogen, США).

Культивирование культуры клеток в малом объеме при перемешивании. Культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера (Corning, США) объемом 125 и 250 мл в шейкере-CO₂-инкубаторе Multitron Cell (Infors HT, Швейцария) с частотой вращения 125 об/мин в атмосфере 5%-ного углекислого газа при температуре 37° С и влажности 95%. Пересев проводили каждые 3-4 дня до плотности $(0,3-0,5) \times 10^6$ клеток/мл.

Трансфекция культуры клеток CHO. Трансфекцию проводили следующими комбинациями экспрессионных векторов:

pcDNA LC Adalimumab + pOptiVec HC Adalimumab,

pOptiVec LC Adalimumab + pcDNA HC Adalimumab,

согласно стандартному протоколу фирмы производителя (Invitrogen, США). Для оценки эффективности трансфекции использовали контрольную плазмиду, кодирующую усиленный зеленый флуоресцентный белок (eGFP) под контролем промотора CMV.

За сутки до проведения трансфекции культуру клеток пересевали до плотности $(0,5 \pm 0,1) \times 10^6$ клеток/мл. В день трансфекции определяли концентрацию жизнеспособных клеток, и осаждали суспензию клеток центрифугированием при 200g в течение 10 мин при комнатной температуре на центрифуге Allegra 25-R (Beckman, Германия). Супернатант удаляли, клетки суспендировали в среде FreeStyle CHO Expression Medium (Invitrogen, США), содержащей 8 мМ аланил-глутамин (Invitrogen, США) до конечной плотности $(1,5 \pm 0,3) \times 10^6$ клеток/мл. Далее проводили трансфекцию в 6-луночных планшетах, согласно рекомендациям производителя. Эффективность трансфекции оценивали визуально с помощью микроскопии SKX41 (Olympus, Япония) в пулах, экспрессирующих ген зеленого флуоресцентного белка.

Отбор минипулов методом предельных разведений с последующей амплификацией и субклонированием. Через сутки после трансфекции осуществляли предельные разведения пула в среде OptiCHO Medium (Life technologies, USA), содержащей раствор антибиотика G418 (Lonza, Швейцария) в концентрации 500 мкг/мл, 10нМ метотрексата (MTX, Sigma, США), 8 мМ глутамин (Gibco, США), 1 г/л альбумина (Sigma, США), 10% кондиционной среды, до плотности 10000, 5000, 1000 клеток/лунку. Суспензию клеток вносили по 100 мкл в лунки 96-луночных планшетов, используя по 30-40 планшетов на каждое разведение. Планшеты культивировали в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5%-ного углекислого газа при температуре 37°C и влажности 95% в течение 14-20 суток. После двух недель культивирования, контролировали рост клеток в лунках под микроскопом, отмечая лунки, в которых наблюдались рост и деление клеток. При достижении 80-100% конфлюэнтности минипулы переносили в 24-луночные

планшеты. Через 5 суток культивирования анализировали пробы культуральной жидкости на уровень экспрессии и целевого антитела методом иммуноферментного анализа «ИФА-БЕСТ» («Вектор-БЕСТ», Россия).

По результатам анализа отбирали положительные минипулы с наибольшей продуктивностью и пересевали в 6-луночные планшеты, после чего снова отбирали положительные минипулы по ростовым характеристикам и продуктивности согласно результатам ИФА.

После определения жизнеспособности клеток минипулы переносили в культуральные флаконы (Corning, США), затем в колбы Эрленмейера (Corning, США), объемом 125 мл для суспензионного культивирования в средах OptiCHO (Life technologies, США) и ActiCHO SM (Hyclone, США) с добавлением 25 нМ MTX (Sigma, США), селективного антибиотика G418 (Lonza, Швейцария) в концентрации 500 мкг/мл и 8Мм глутамина (Gibco, США). На основании оценки ростовых характеристик, жизнеспособности и продуктивности выбирали лучшие минипулы и проводили их амплификацию с 25 нМ, 500 нМ, 1000 нМ MTX. Затем субклонировали методом предельных разведений в 96-луночных планшетах в концентрации 0,5 клеток/лунку.

Амплификация общего пула трансфицированных клеток. Через сутки после трансфекции проводили селекцию клеток, получивших искомые плазмиды, несущих гены легкой и тяжелой цепи антитела. Для этого клетки перевели на селективную среду OptiCHO (Life technologies, США), содержащую 500 нМ MTX (Sigma, США), 500мкг/мл антибиотика G418 (Lonza, Швейцария). Каждые 2-3 дня осуществляли полную смену среды (центрифугированием на Allegra 25R (Beckman, Германия), 200g в течение 5 минут), затем переносили клетки в свежую селективную среду в конечной концентрации жизнеспособных $(0,2-0,3) \times 10^6$ клеток/мл. Через 40 дней, при достижении жизнеспособности 90% пул переводили в среду, содержащей увеличенную концентрацию 1000 нМ MTX (Sigma, США). Последние раунды амплификации общего пула проводили при концентрациях MTX

(Sigma, США) 2,5 и 5 мкМ. Для отбора индивидуальных клонов-продуцентов из общего амплифицированного пула при достижении жизнеспособности клеток более 90% использовали метод предельных разведений 0,5 клеток/лунку.

Определение концентрации моноклонального антитела адалимумаб в культуральной жидкости методом иммуноферментного анализа. Для количественного определения мАТ адалимумаб в образцах КЖ использовали набор Serazym® IgG ELISE kit (Seramun, Германия) и ИФА-БЕСТ (Вектор-бест, Россия). КЖ разводили буфером, входящим в комплект набора, до средней эффективной концентрации по калибровочной кривой. Процедуру проводили в соответствии с инструкциями производителя. Учёт результатов анализа проводили на спектрофотометре Sunrise (Tecan, Швейцария) при длине волны 450 нм. В качестве контроля использовали оригинальный препарат Хумира (ABBOTT, США).

Определение концентрации моноклонального антитела адалимумаб в культуральной жидкости методом ВЭЖХ. Осуществляли методом гель-фильтрации на колонке TSKgel G2000SW (Tosoh Bioscience, Германия).

SDS-ПААГ-электрофорез в восстанавливающих условиях. Проводили по стандартной методике Лэммли в 12% геле с последующим окрашиванием Кумасси-R250.

Подсчет числа клеток и расчет ростовых характеристик клеточной линии. Подсчет числа клеток проводили с помощью камеры Горяева на микроскопе СКХ41 (Olympus, Япония) или с помощью автоматического счётчика клеток TC-10 (Bio-Rad, США). Определение жизнеспособности клеток осуществляли после окрашивания 0,3% раствором трипанового синего (Panreac, Испания).

Расчет скорости роста μ проводили по следующей формуле:

$$\mu = (\ln (N_A / N_B)) / (t_B - t_A), \text{ ч}^{-1} \quad (1)$$

где N_A и N_B – концентрации жизнеспособных клеток на нулевой и последний дни культивирования,

t_A и t_B – время в часах на момент засева инокулята и остановки культивирования.

Расчет времени удвоения t_d проводили по следующей формуле:

$$t_d = \ln (2) / \mu, \text{ ч} \quad (2)$$

Культивирование суспензионной культуры клеток CHO в малом объеме при перемешивании. Культивирование осуществляли в шейкере-СО₂-инкубаторе Multitron Cell (Infors, Швейцария) в атмосфере 5%-ного СО₂ при температуре 37 °С и относительной влажности 95% в колбах Эрнленмейера (Corning, США) на 125, 250, 1000 мл. Объем заполнения колб составлял 20-30% мл, скорость перемешивания – (120±10) об/мин. Каждые 3-4 дня определяли клеточную плотность и жизнеспособность на счетчике клеток TC10 (Bio-Rad, США) и проводили субкультивирование путем разбавления суспензии клеток свежей средой до плотности (0,4±0,1)×10⁶ клеток/мл.

Скрининг сред и подпиток для культивирования клеточной линии CHO-DHFR-ADMB26. Для оптимизации условий культивирования клеточной линии использовали большой набор питательных сред и подпиток от разных производителей (Таблица 3). Все среды и подпитки не содержали компонентов животного происхождения и были предназначены для суспензионного культивирования клеток CHO.

Адаптацию клеток к новым средам проводили следующим образом. В день очередного субкультивирования переносили суспензию клеток в смесь равных объемов старой и новой среды в плотности (0,4±0,1)×10⁶ клеток/мл. На следующем пассаже переносили суспензию полностью в новую среду в такой же плотности. После этого проводили не менее 4 пассажей в новой

среде с плотностью засева $(0,3 \pm 0,1) \times 10^6$ клеток/мл до стабилизации времени удвоения.

Культивирование в замкнутом объеме с подпитками (в режиме *fed-batch*) в колбах при перемешивании. Длительное культивирование в цикле продукции с подпитками (культивирование в режиме *fed-batch*) проводили как по схемам, рекомендованным производителями, так и с их адаптацией в CO₂-инкубаторе Multitron Cell (Infors, Швейцария) в атмосфере 5%-ного CO₂ при температуре 37 °C и относительной влажности 95% в колбах Эрнленмейера (Corning, США) на 125 мл. Объем заполнения колб составлял 20-30% мл, скорость перемешивания – (120 ± 10) об/мин. Засев инокулята осуществляли в плотности $(0,50 \pm 0,05) \times 10^6$ клеток/мл. В течение процесса культивирования осуществляли ежедневный мониторинг параметров, согласно таблице 4.

Таблица 3 – Список сред и подпиток, использованных в разработке технологии культивирования продуцента МАТ адалимумаб

Производитель	Среда	Подпитка
GE Healthcare (Hyclone/PAA) США	SFM4CHO Hycell CDM4CHO ActiCHO ActiCHO P (производитель заменил на ActiPro)	Cellboost 1–6 ActiCHO Feed A/B (производитель заменил на Cellboost 7A/B)
Life Technologies (Gibco) США	Dynamis OptiCHO	Efficient Feed A+, B+, C+
Amimed Швейцария	MAM-PF77	FMS3, FMU
Merck Германия	Cellvento 200/210/220	Cellvento Feed 200/210/220
Sigma-Aldrich США	EX-Cell Advanced	EX-Cell Advanced Feed 1
Irvine Scientific США	BalanCD Growth A	BalanCD Feed 2
Lonza Швейцария	PowerCHO-2CD	PowerFeed A

Измеряли концентрацию глюкозы и лактата в культуральной жидкости с помощью анализатора Accutrend Plus (Roche, США). При необходимости добавляли глюкозу (Amimed, Швейцария) в требуемом количестве из расчета на сутки, учитывая ее содержание во вносимой ежедневно подпитке.

По результатам культивирования строили графики клеточной плотности и жизнеспособности, рассчитывали кумулятивную клеточную плотность за все дни культивирования, кумулятивное потребление глюкозы за все дни культивирования и удельную продуктивность.

Таблица 4 – Критические параметры процесса культивирования в режиме fed-batch и корректирующие действия

Параметр	Кратность измерения	Корректирующее действие
Клеточная плотность	Ежедневно, с 3-го дня	Увеличивали количество подпитки при замедлении скорости роста
Жизнеспособность	Ежедневно, с 3-го дня	Увеличивали количество подпитки при падении жизнеспособности более чем на 5%. Завершали процесс при падении жизнеспособности ниже 60%
Концентрация глюкозы	Ежедневно, с 3-го дня	Рассчитывали суточное потребление глюкозы (СПГ) перед внесением подпитки. Вносили раствор глюкозы при концентрации меньше суточного потребления (СПГ+1 г/л).
Концентрация лактата	5,7, 10, 12 дни	При увеличении концентрации лактата более 2 г/л, уменьшали количество подпитки. При уменьшении концентрации лактата менее 0,5 г/л, замедлении клеточного роста и падении жизнеспособности увеличивали количество вносимой подпитки
pH	В случае ухудшения ростовых характеристик и повышения лактата более 2 г/л	Увеличивали или уменьшали процентное содержание CO ₂ в зависимости от того, в какую сторону необходимо было сдвинуть pH
Продуктивность	На последние сутки культивирования, начиная с 10-го дня	-

Определение стабильности продуцирования моноклонального антитела адалимумаб. Перспективные клоны исследовали на стабильность в течение 60 генераций в течение двух месяцев. Культивирование

осуществляли без селективного антибиотика в колбах Эрленмейера на 125 мл при перемешивании. Начальной точкой отбора считали измерение концентрации антитела в культуральной жидкости на 3-й день культивирования сразу после адаптации клеточной культуры в колбы Эрленмейера из 6-ти луночных планшетов. В течение двух месяцев культивирования (около 60 генераций) измеряли концентрацию антитела в образцах культуральной жидкости методом ИФА, полученной в результате коротких циклов продукции (в течение 4-ех суток), и вычисляли удельную продуктивность в пг/клетку/день (pcd) по формуле:

$$pcd = \frac{P_n - P_0}{n} \cdot \frac{\ln\left(\frac{CD_n}{CD_0}\right)}{CD_n - CD_0}, \quad (3)$$

где P_0 и P_n – концентрации целевого белка в культуральной жидкости на нулевой и последний дни, CD_0 и CD_n – концентрации жизнеспособных клеток на нулевой и последний дни культивирования.

Падение pcd определяли в процентах.

Замораживание суспензионной культуры клеток CHO-DHFR-ADMB26. Предварительно наращивали биомассу до необходимой концентрации жизнеспособных клеток в экспоненциальной фазе роста. Подсчет числа клеток проводили с помощью автоматического счётчика клеток TC-10 (Bio-Rad, США). Осаждали культуру клеток при 200g в течение 5 мин при комнатной температуре на центрифуге Allegra 25R (Beckman, Германия). Супернатант удаляли, осадок суспендировали в свежей подогретой среде для криоконсервации (среда, содержащая 10% ДМСО (Sigma, США)) до конечной концентрации $(5 \pm 1) \times 10^6$ клеток/мл. Суспензию клеток разливали по 1 в маркированные криопробирки (Corning, США), которые затем помещали в пенопластовые криоконтейнеры и инкубировали при температуре $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 1 ч, при температуре минус $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 4 ч, при минус $(80 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение суток. После замороженные таким образом клетки переносили в криохранилище для длительного хранения в жидком азоте.

Культивирование в стеклянном биореакторе с механическим перемешивающим элементом. Использовали биореакторы перемешивающего типа Labfors (Infors HT, Швейцария) и Applikon (BioBundle, Нидерланды) с набором стеклянных колб объемом 3 л (рабочий объем до 2 л) и 7 л (рабочий объем до 5 л). Посевная плотность составляла $(0,5 \pm 0,1) \times 10^6$ клеток/мл, значение pH и содержание растворенного кислорода (DO) поддерживали на уровне $(7,0 \pm 0,2)$ и (40 ± 10) %, соответственно. Регуляцию pH осуществляли с помощью подачи CO_2 и 0,5 М NaHCO_3 (Sigma-Aldrich, США). Регуляцию уровня растворенного кислорода в начале процесса осуществляли азотом и воздухом, затем воздухом и кислородом по мере увеличения концентрации жизнеспособных клеток и скорости потребления кислорода. Сжатый воздух, обогащенного кислородом подавали с помощью концентратора Оху 5000 (Bitmos, Германия). Скорость вращения мешалки типа «морской винт» составляла (130 ± 50) об/мин (каскадное регулирование). Смесь газов подавали в пространство над КЖ, а также пропускали через среду посредством барботирования. Начиная с 3 суток культивирования, проводили ежедневный отбор проб для определения количества и жизнеспособности клеток и концентрации метаболитов. При необходимости добавляли глюкозу (Amimed, Швейцария) до концентрации (5 ± 1) г/л, учитывая ее содержание в подпитке и скорость метаболизма клеток. Подпитки вносили каждые сутки, начиная с третьего дня культивирования через насос контроллера.

Культивирование в биореакторе волнового типа. Культивирование осуществляли в одноразовом биореакторе на качающейся платформе Appliflex с системой управления ez-Control (Applikon, Нидерланды). Использовали одноразовые мешки для культивирования объемом 10 и 50 л. Посевная плотность составляла $(0,5 \pm 0,1) \times 10^6$ клеток/мл, значение pH и содержание растворенного кислорода (DO) поддерживали на уровне $(7,0 \pm 0,2)$ и (40 ± 10) %, соответственно. Регуляция pH осуществляли с помощью подачи CO_2 и 0,5 М NaHCO_3 (Sigma-Aldrich, США). Регуляцию уровня

растворенного кислорода в начале процесса осуществляли азотом и воздухом, затем воздухом и кислородом по мере увеличения концентрации жизнеспособных клеток и скорости потребления кислорода. Сжатый воздух, обогащенного кислородом подавали с помощью концентратора Оху 5000 (Bitmos, Германия). Культивировали при скорости перемешивания 25 г/м, при этом угол наклона платформы составлял 8 градусов. Смесь газов подавали в пространство над КЖ. Начиная с 3 суток культивирования, проводили ежедневный отбор проб для определения количества и жизнеспособности клеток и концентрации метаболитов. При необходимости добавляли глюкозу (Amimed, Швейцария) до концентрации (5 ± 1) г/л, учитывая ее содержание в подпитке и скорость метаболизма клеток. Подпитки вносили каждые сутки, начиная с третьего дня культивирования через насос контроллера.

Культивирование осуществляли как в однофазном температурном режиме 37 °С, так и в двухфазном, путем снижения температуры культивирования с 37 до 35 °С при плотности больше 20×10^6 клеток/мл, затем до 33 °С через 7-16 часов.

Культивирование в биореакторе орбитального типа. Использовали орбитальный биореактор Kühner SB10X и SB50X (Kühner AG, Швейцария) с одноразовыми мешками на 10 и 50 л для культивирования клеток с высоким уровнем массообмена при перемешивании (90 ± 10) г/м. Плотность инокулирования, регуляция pH и уровня растворенного кислорода, подача газов и другие условия культивирования соответствовали режиму в биореакторе волнового типа.

Фильтрация культуральной жидкости. Культуральную жидкость, полученную на стадии культивирования, фильтровали тремя способами. Первый способ заключался в удалении крупных частиц Sartoclear PB1 (11-4 мкм) с последующей стерилизующей фильтрацией с использованием фильтра с широкой химической совместимостью Sartopore 2 XLG ($0.8 + 0.2$ мкм). Второй – с использованием последовательного сочетания PB1 (11-4

мкм) и РВ 2 (8-1 мкм), с последующей стерилизующую фильтрацию на Sartopore 2 XLG (0.8+0.2 мкм). И третий способ осуществляли в несколько стадий на РВ1 (11-4 мкм), затем на РРЗ (1,2 мкм). Последний этап был аналогичным первым двум.

Выделение моноклонального антитела Адалимумаб из культуральной жидкости. Проводили ВЭЖХ на колонке HiScale 50/20 сорбентом MabSelect Sure LX (GE Healthcare, США). Нанесение осуществляли в 10% градиенте 5М хлорида натрия (Sigma, США). Элюцию осуществляли глицином (Sigma, США). Белок доводили до pH (6,0±0,5) 1М буферным раствором Tris*HCl pH 8.0. В полученных афинных элюатах определяли концентрацию белка методом спектрофотометрии (Biorad, США).

Подготовка афинных элюатов, содержащих моноклональное антитело адалимумаб для анализа профиля гликозилирования. Предварительно осуществляли обессоливание элюатов на микроцентрифужных концентраторах VivaSpin 500 (Sartorius, Германия) 5 мМ натрий фосфатным буфером с pH 7.0. На фильтрующую мембрану наносили 500 мкг антитела и доводили буфером объем элюата до 500 мкл и концентрировали в ~10 раз на центрифуге 5417R (Eppendorf, Германия) при скорости 10 000g и температуре 4 °C в течение ~20 мин, затем снова доводили объем до 500 мкл ранее используемым буфером и повторяли стадию центрифугирования так же в течение 20 мин. В конечном итоге, процедуру повторили 3 раза. Конечные объемы обессоленных образцов доводили буфером до 250 мкл.

В полученные обессоленные образцы вносили фермент N-Glycosydase (Roche, Швейцария) из расчёта 5 единиц (5 мкл раствора фермента) на 500 мкг белка и инкубировали полученные образцы при температуре 37 °C в термостате (Binder, Германия) в течение 18 ч. Реакцию останавливали замораживанием образцов при -30 °C.

Анализ профиля гликанов методом хромато-масспектрометрии.

Предварительно разделяли молекулы целевых гликанов и сопутствующие компоненты матрицы на хроматографе 1260 Infinity (Agilent, США) с последующей их ионизацией в ионном источнике масс-спектрометра Bruker Maxis Impact (QqTOF, Германия), разделением и детекцией получившихся ионов в масс-анализаторе.

Размораживание культуры клеток WEHI164, чувствительной к ФНО-альфа для определения биологической активности моноклонального антитела адалимумаб in vitro. Содержимое криопробирки с суспензией клеток в течение 1-2 мин размораживали на водяной бане TW-2 (Elmi, Латвия) при 37 °С, затем переносили в предварительно подогретую среду RPMI-164 (ПанЭко, Россия) и центрифугировали при 200g в течение 5 мин при комнатной температуре на центрифуге Allegra 25R (Beckman, Германия). Супернатант удаляли, осадок суспендировали в полной питательной среде, содержащей 2 mM аланил-глутамин (Gibco, США), 10% сыворотки крови эмбриональной телячьей (HyClone, США) и 50 мг/л пенициллин/стрептомицин (ПанЭко, Россия), затем суспензию клеток переносили в культуральный флакон T25 (Corning, США). Культивирование осуществляли в стационарном CO₂-инкубаторе MCO-18M (Sanyo, Япония) в атмосфере 5%-ного углекислого газа при температуре 37 °С и относительной влажности 95%.

Стационарное культивирование адгерентной культуры клеток WEHI164. Пересев осуществляли каждые 4-5 дня до плотности $(0,2 \pm 0,1) \times 10^6$ клеток/мл. Для открепления культуры клеток от подложки культурального флакона использовали смесь растворов трипсина 0,25% (ПанЭко, Россия) и Версена 0,02% (ПанЭко, Россия) в соотношении 1:5. Подсчет клеток и анализ их жизнеспособности осуществляли после окрашивания трипановым синим (Panreac, Испания) с помощью автоматического счетчика клеток TC-10 (Bio-Rad, США).

Исследование биологической активности Адалимумаба in vitro. Суть процедуры заключалась в ингибировании моноклональным антителом Адалимумаб токсичного влияния ФНО-альфа на культуру клеток WEN164.

Использовали следующие растворы:

- ростовая среда (РС) для культивирования: среда RPMI-1640 с добавлением 2 mM аланил-глутамин (Gibco, США), 10% сыворотки крови эмбриональной телячьей (HyClone, США) и 50 мг/л пенициллин/стрептомицин (Панэко, Россия);
- базовый раствор актиномицина Д (Sigma, США) с концентрацией 50 мкг/мл;
- фосфатно-буферный раствор (Sigma, США), содержащий 1% альбумина человеческого сывороточного (Sigma, США);
- раствор ФНО-альфа (R&D Systems, США) 0,1 нг/мл в ростовой среде.

В качестве стандартного образца использовали оригинальный препарат Хумира (ABBOTT, США).

На первом этапе осуществляли засев культуры клеток WEN164 в 96-луночные планшеты в ростовой среде и инкубировали в атмосфере 5%-ного углекислого газа при температуре 37°C и влажности 95% в течение суток. На второй день для повышения чувствительности к ФНО-альфа клетки инкубировали в ростовой среде, содержащей антибиотик актиномицин Д в течение 3 часов. Для этого готовили раствор актиномицина с концентрацией 0,5 мкг/мл в ростовой среде. Удаляли кондиционированную среду из всех лунок планшета и вносили по 100 мкл/лунку приготовленного раствора актиномицина Д (0,5 мкг/мл). Инкубировали в течение 2-3 ч в атмосфере 5%-ного углекислого газа при температуре 37°C и влажности 95%. Затем удаляли из лунок рядов А-Г среду, и вносили по 50 мкл ростовой среды с ФНО-альфа во все лунки рядов В-Г. В лунки А1-А6 вносили ростовую среду (первый положительный контроль), в лунки А7-А12 первого ряда вносили по 100 мкл ростовой среды с ФНО-альфа (второй положительный контроль). В лунки

рядов А-Г дополнительных 96-луночных планшетов вносили по 120 мкл ростовой среды с ФНО-альфа.

Готовили растворы испытуемого и стандартного образцов (ИСП и СТД) в ростовой среде в концентрации 4 мкг/мл и дополнительный 96-ти луночный планшет для титрования ИСП и СТД. Для этого вносили по 120 мкл РС+ФНО-альфа в лунки А1-А12, В1-В12, С1-С12, D1-D12, E1-E12, F1-F12.

В дополнительный планшет вносили по 120 мкл растворов СТД в концентрации 4 мкг/мл в лунки А1, В1, С1 и по 120 мкл ИСП в концентрации 4 мкг/мл в лунки D1, E1, F1. С помощью мультиканального дозатора в дополнительном планшете делали последовательные двукратных разведения, каждое в 3-х повторностях для стандартного образца и испытуемой пробы, начиная с концентрации 2 мкг/мл, перенося по 120 мкл.

С помощью мультиканальной пипетки отбирали из дополнительных планшетов по 50 мкл разведений ИСП и СТД и вносили в соответствующие 2-12 лунки рядов В-Г рабочих планшетов в соответствии со схемой, представленной в таблице 5.

Рабочие планшеты инкубировали в течение суток в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С в 5% атмосфере углекислого газа и 90% влажности.

На третий день по завершению инкубации в каждую лунку вносили по 10 мкл витального красителя WST-1 (Sigma, США) и инкубировали в атмосфере 5%-ного углекислого газа при температуре 37°С и влажности 95% в течение 2 ч, предварительно перемешав содержимое лунок на планшетном шейкере PSU-2T (Biosan, Латвия). Измеряли поглощение света при 450 нм с помощью планшетного спектрофотометра Multiskan (Thermo Scientific, США).

Полученные данные оптической плотности обрабатывали в программе Microsoft Office Excel. Строили кривые зависимости уровня пролиферации клеток линии WEN164, ингибированной ФНО-альфа, от десятичного логарифма концентрации моноклонального антитела Адалимумаб.

Рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение и относительное отклонение по шести параллельным измерениям для стандартного и испытуемого образцов. Для расчета использовали встроенные функции приложения Microsoft Office Excel 2007 СРЗНАЧ и СТАНДОТКЛОН.

Таблица 5 – Схема внесения препаратов СТД и «Адалимуаб» в 96-луночные планшеты. В ячейках таблицы приведены концентрации испытуемого образца субстанции (ИСП) и стандартного образца препарата (СТД), нг/мл

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	актД	актД	актД	актД	актД	актД	ФНОα	ФНОα	ФНОα	ФНОα	ФНОα	ФНОα
B	СТД 1000	СТД 500	СТД 250	СТД 125	СТД 62,5	СТД 31,25	СТД 15,625	СТД 7,8125	СТД 3,906	СТД 1,953	СТД 0,977	СТД 0,488
C	СТД 1000	СТД 500	СТД 250	СТД 125	СТД 62,5	СТД 31,25	СТД 15,625	СТД 7,8125	СТД 3,906	СТД 1,953	СТД 0,977	СТД 0,488
D	СТД 1000	СТД 500	СТД 250	СТД 125	СТД 62,5	СТД 31,25	СТД 15,625	СТД 7,8125	СТД 3,906	СТД 1,953	СТД 0,977	СТД 0,488
E	ИСП 1000	ИСП 500	ИСП 250	ИСП 125	ИСП 62,5	ИСП 31,25	ИСП 15,625	ИСП 7,8125	ИСП 3,906	ИСП 1,953	ИСП 0,977	ИСП 0,488
F	ИСП 1000	ИСП 500	ИСП 250	ИСП 125	ИСП 62,5	ИСП 31,25	ИСП 15,625	ИСП 7,8125	ИСП 3,906	ИСП 1,953	ИСП 0,977	ИСП 0,488
G	ИСП 1000	ИСП 500	ИСП 250	ИСП 125	ИСП 62,5	ИСП 31,25	ИСП 15,625	ИСП 7,8125	ИСП 3,906	ИСП 1,953	ИСП 0,977	ИСП 0,488
H	к	к	к	к	к	к	среда	среда	Среда	среда	среда	среда

В ячейках таблицы приведены концентрации испытуемого стандартного образцов, нг/мл. Лунки A1-A6. Клетки, инкубированные в присутствии актиномицина Д в течение 3 ч. Лунки А 7-A12. Клетки, инкубированные в присутствии ФНОα-альфа прединкубированные с актиномицином Д. Ряды В,С, D. Клетки прединкубированы с актиномицином Д в течение 2-3 ч, инкубированы с ФНО-альфа и ИСП, концентрации в нг/мл указаны в лунках.

Ряды E, F, G. Клетки прединкубированы с актиномицином Д в течение 3 ч, инкубированы с ФНО-альфа и СТД, концентрации в нг/мл указаны в лунках. В 8ом ряду лунок 1-6 клетки инкубировали в ростовой среде. В 8 ряд лунок 7-12 вносили ростовую среду.

С помощью программы Origin Pro 8 аппроксимировали полученные данные 4-параметрической логистической функцией, рассчитывали концентрацию моноклонального антитела Адалимуаб, соответствующую половинному значению максимальной нейтрализации цитотоксичности фактора некроза опухолей, рассматриваемой в качестве 50% эффективной дозы (EC50).

Активность испытуемого образца рассчитывали по формуле:

$$\text{Биологическая активность ИСП} = (\text{EC50 СТД} / \text{EC50 ИСП}) * 100$$

Опыт считали достоверно проведенным, и результаты учитывали, если выполнялись следующие условия, указанные в таблице 6.

Таблица 6 – Условия проведения эксперимента по исследованию биологической активности Адалимумаба *in vitro*

Параметр	Спецификация, ЕОП
Величина поглощения среды ростовой не более	Не более 0,2
В лунках с положительным контролем 1 (клетки + актиномицин Д)	$\geq K1 * 0,7 * 100\%$ (не менее 70% от величины оптической плотности клеточного контроля (ростовая среда))
В лунках с положительным контролем 2 (клетки + актиномицин Д + ФНО α)	$\leq K1 * 0,3 * 100\%$ (не более 30% от величины оптической плотности клеточного контроля (ростовая среда))
В лунках с отрицательным контролем (клетки без обработки) K1	Не более 3,5

Исследование эффекторных функций полученного антитела в сравнении с оригинальным препаратом. Проводили иммуноферментный анализ на эффективность связывания моноклонального антитела адалимумаб с Fc γ RIIA (CD16a). Для этого за сутки до эксперимента предварительно вносили раствор рецептора Human CD16a/FCGR3A Protein (Sino Biological Inc., Китай) в концентрации 1 мкг/мл, растворенного в фосфатно-буферном растворе (Sigma, США), в 96-луночные для иммуноферментного анализа (Corning, США).

В тот же день готовили рабочие разведения контрольных образцов в фосфатно-буферном растворе в конечном объеме 200 мкл: Хумиры (ABBOTT, США) до концентрации 4 мкг/мл и комплекса Хумира (ABBOTT, США) с ФНО-альфа (лиофилизат антигена ActiveMax Recombinant Human TNF α , AcroBiosystem, США) в молярном соотношении 1:1,5. Образцы исследуемых образцов моноклонального антитела адалимумаб разводили последовательно в фосфатно-буферном растворе (Sigma, США) до концентрации 4 мкг/мл и аналогичным образом готовили комплекс исследуемого образца с ФНО-альфа в молярном соотношении 1:1,5.

Инкубировали подготовленные растворы контрольных и исследуемых образцов в течение суток при 4 °C.

На следующий день готовили необходимые растворы в фосфатно-буферном растворе:

- Block-буфер: 1% раствор бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США);
- Wash-буфер: 0,1% Твин-20 (Sigma, США);
- PBS-БТ: 1% раствор бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США), содержащий 0,1% Твин-20 (Sigma, США);
- STOP раствор: ортофосфорной кислоты (Sigma, США) 25% раствор.

После инкубации 96-луночного планшета с рецептором Human CD16a/FCGR3A Protein (Sino Biological Inc., Китай) промывали лунки 3 раза по 200 мкл/лунку Wash-буфером. Затем вносили во все лунки планшета по 200 мкл Block- буфера и инкубировали планшет при 22 °C в течение 2 ч. Снова промывали планшет 3 раза по 200 мкл/лунку Wash-буфером. Вносили во все лунки планшета по 50 мкл раствора PBS-БТ, кроме ряда A1-H1. В первый ряд A1-H1 вносили по 75 мкл образцов (приготовленных в первый день: Хумира, Хумира+ФНО-альфа, мАТ адалимумаб, мАТ адалимумаб+ФНО-альфа). Затем осуществляли последовательные трехкратные разведения (переноса по 25 мкл раствора из каждого ряда слева направо).

Затем инкубировали планшет при 22 °C в течение 60 мин. Промывали планшет 3 раза по 200 мкл/лунку Wash-буфером. Вносили по 50 мкл/лунку конъюгата вторичных антител Goat AntiHuman IgG Fc (Abcam, США), разведенного в PBS-БТ 1:10000. Инкубировали планшет при 22 °C в течение 60 мин, затем промывали 3 раза по 200 мкл/лунку Wash-буфером. Вносили во все лунки планшета по 50 мкл раствора Раствор субстрата тетраметилбензидина для (Sigma, США) и инкубировали 15 мин. Реакцию останавливали внесением 25% раствора ортофосфорной кислоты (Sigma, США). Измеряли оптическую плотность при 450 нм на спектрофотометре

Infinite M200pro (Tecan, Австрия). Результаты обсчитывали в программе OriginPro 8.1.

Пробоподготовка образцов биосимилярного мАТ Адалимумаб и оригинального препарата для исследования заряженных изоформ.

Обработку обессоленных образцов антитела для проведения ионно-обменной хроматографии и изоэлектрического фокусирования осуществляли следующим образом:

№	Образец	Обработка	Условия
1	Хумира (Abbot, США)	(-) контроль	без обработки, 37 °С, 18 ч
2		+ карбоксипептидаза В	+ 17 ед. СрВ* (15 мкл), 37 °С, 18 ч
3		+ N-гликозидаза	+ 1 ед. NGF ** (1 мкл), 37 °С, 18 ч
4	Элюат мАТ Адалимумаб	(-) контроль	без обработки, 37 °С, 18 ч
5		+ карбоксипептидаза В	+ 17 ед. СрВ* (15 мкл), 37 °С, 18 ч
6		+ N-гликозидаза	+ 1 ед. NGF (1 мкл), 37 °С, 18 ч

*СрВ – карбоксипептидаза В (Serva, США) концентрация 7,5 мкг/мкл, активность – 150 ед/мг белка, добавлена из расчёта 17 ед. активности (15 мкл раствора фермента) на 150 мкг антитела;

**NGF – N-Glycosydase F (Roche, Швейцария), активность 100 ед/1 мкл раствора, из расчёта 1,5 ед. активности (1,5 мкл раствора фермента) на 150 мкг антитела.

Реакцию останавливали замораживанием образцов при -30 °С. Анализ методом ИОХ осуществляли методом обращено-фазовой ВЭЖХ на системе UltiMate 3000 (Dionex, США) с использованием колонки YMC-BioPro (YMC, Япония), использовали 20 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.50. Скорость потока составляла 0,5 мл/мл, объем вкола – 25 мкл (раствор белка с концентрацией 1 мг/мл). Анализ проводили при температуре 25 °С, элюирующиеся с колонки компоненты детектировали с помощью УФ-детектора при длине волны 280 нм.

Статистическая обработка результатов экспериментов.

Экспериментальные данные обрабатывали методом статистического анализа с использованием компьютерных программ «Microsoft Office Excel» и «Statistica 8.0».

3.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.2.1. Создание клеточной линии, стабильно продуцирующей моноклональное антитело адалимумаб

3.2.1.1. Дизайн экспрессионных конструкций

На начальном этапе работы синтезировали гены тяжелой и легкой цепей моноклонального антитела адалимумаб, оптимизированные по кодонному составу. Последовательности генов были получены из общедоступных источников информации и патентных баз данных. Для внеклеточной секреции антитела в культуральную жидкость к последовательностям легкой и тяжелой цепей добавили сигнальные пептиды человеческого альбумина и дополнительные рестриктивные сайты по 5' и 3' концам синтетических генов. Для подтверждения правильности последовательностей синтезированных генов оригинальный препарат Хумира (ABBOTT, США) подвергли пептидному картированию с предварительным трипсинолизом и, таким образом, получили полное совпадение последовательностей (данные не приведены).

Для создания экспрессионных конструкций использовали коммерческие плазмидные вектора на основе pOptiVec и pcDNA (ThermoFisher, США). Такой выбор был обоснован наличием гена дигидрофолатредуктазы в одном из векторов, что предполагало эффективное использование этого преимущества в рамках эндогенной амплификации копий генов на клетку в дигидрофолат/метотрексатной системе с целью получить высокопродуктивную стабильную клеточную линию на основе CHO (dhfr-). Кроме того, по литературным данным такой подход описан как наиболее часто применяемый для контрасфекции генов, кодирующих тяжелую и легкую цепи антитела.

Гены моноклонального антитела адалимумаб клонировали в плазмидные векторы pOptiVec и pcDNA по соответствующим сайтам

рестрикции. Таким образом, получили две комбинации: pcDNA-LC и pOptiVec-HC, pOptiVec-LC и pcDNA-HC, где ген интереса находился под контролем конститутивного промотора цитомегаловируса человека (hCMV) в обеих плаزمиде. Правильность сборки экспрессионных векторов проверяли методом рестрикционного анализа (рис. 16), в результате чего полученные данные совпали с ожидаемыми. Наряду с этим перед наработкой необходимого количества плазмидных векторов для трансфекции предварительно нуклеотидные последовательности генов интереса и прилежащих к ним участков были также проверены и подтверждены секвенированием (данные не приведены).

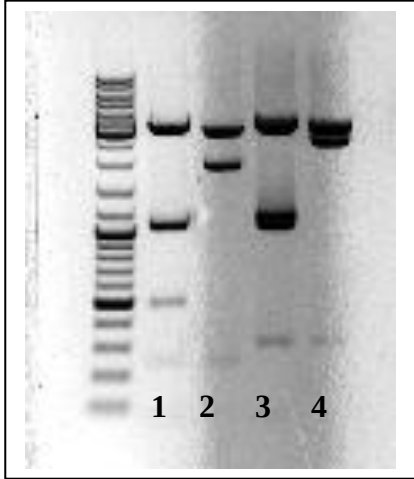
Продукты расщепления плазмид по сайтам PstI и PvuII (рестриктазы ThermoFisher, США)	
 Контроль GeneRuler DNA Ladder Mix (ThermoScientific, США)	п.о.
	3132
	1071
	1043
1. pcDNA™ 3.3- LC-adalimumab	488
	228
2. pOptiVEC™ - LC-adalimumab	2915
	1881
	228
3. pcDNA™ 3.3 - HC-adalimumab	3213
	1127
	1071
	1043
	293
4. pOptiVEC™ - HC-adalimumab	2996
	2520
	291

Рисунок 16 – Продукты расщепления плазмидных векторов pOptiVEC и pcDNA3.3, несущих тяжелую и легкую цепи антитела адалимумаб, методом горизонтального электрофореза в 1.0%-ном агарозном геле

Чтобы выбрать оптимальную комбинацию векторов для экспрессии целевого антитела, осуществляли транзientную котрансфекцию CHO-S каждой комбинацией векторов в пяти повторностях. В результате сравнения уровня экспрессии между полученными трансфектантами получили воспроизводимые результаты. Было отмечено, что котрансфекция комбинацией

векторов рOptiVEC-НС и рсDNA-LC обеспечивает количество экспрессируемого антитела в 3 раза больше, чем в случае рOptiVec-LC и рсDNA-НС (рис. 17). Это позволило эффективно использовать комбинацию векторов рOptiVEC-НС и рсDNA-LC (на рисунках 18 и 19 приведены карты) для стабильной трансфекции клеточной линии CHO-DG44.

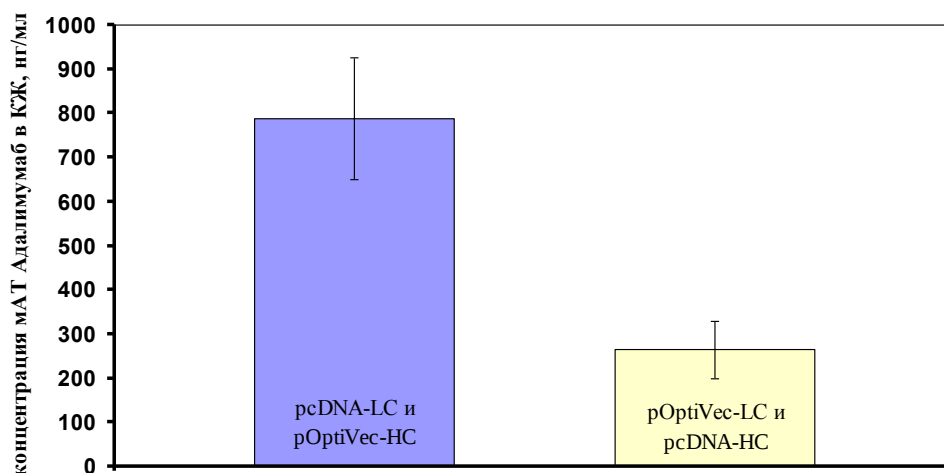


Рисунок 17 – Результаты транзientной котрансфекции *CHO-S* двумя комбинациями векторов в целях сравнения уровня экспрессии мАТ адалимумаб. Эксперимент проводили в пяти повторностях. Сравнивали средние значения по концентрации мАТ адалимумаб в КЖ на следующий день после трансфекции

В рамках разработки клеточной линии, стабильно продуцирующей мАТ адалимумаб, использовали две стратегии отбора клонов. В связи с этим, выполняли котрансфекцию клеток CHO-DG44 (dhfr-) векторами рOptiVEC-НС и рсDNA-LC с использованием реагента Lipofectamine 2000 (ThermoFisher, США) в двух повторностях в одинаковых условиях. Затем полученные пулы трансфецированных клеток с эффективностью 20-30% параллельно использовали в двух независимых исследованиях: в первом использовали трансфецированный пул для отбора минипулов методом предельных разведений с их последующей амплификацией и субклонированием, во втором – для отбора индивидуальных клонов методом предельных разведений общего амплифицированного пула. Результаты двух стратегий подробно описаны и рассмотрены в следующем разделе. Последовательность этапов получения трансфецированных пулов CHO-DG44 представлена на схеме 1.

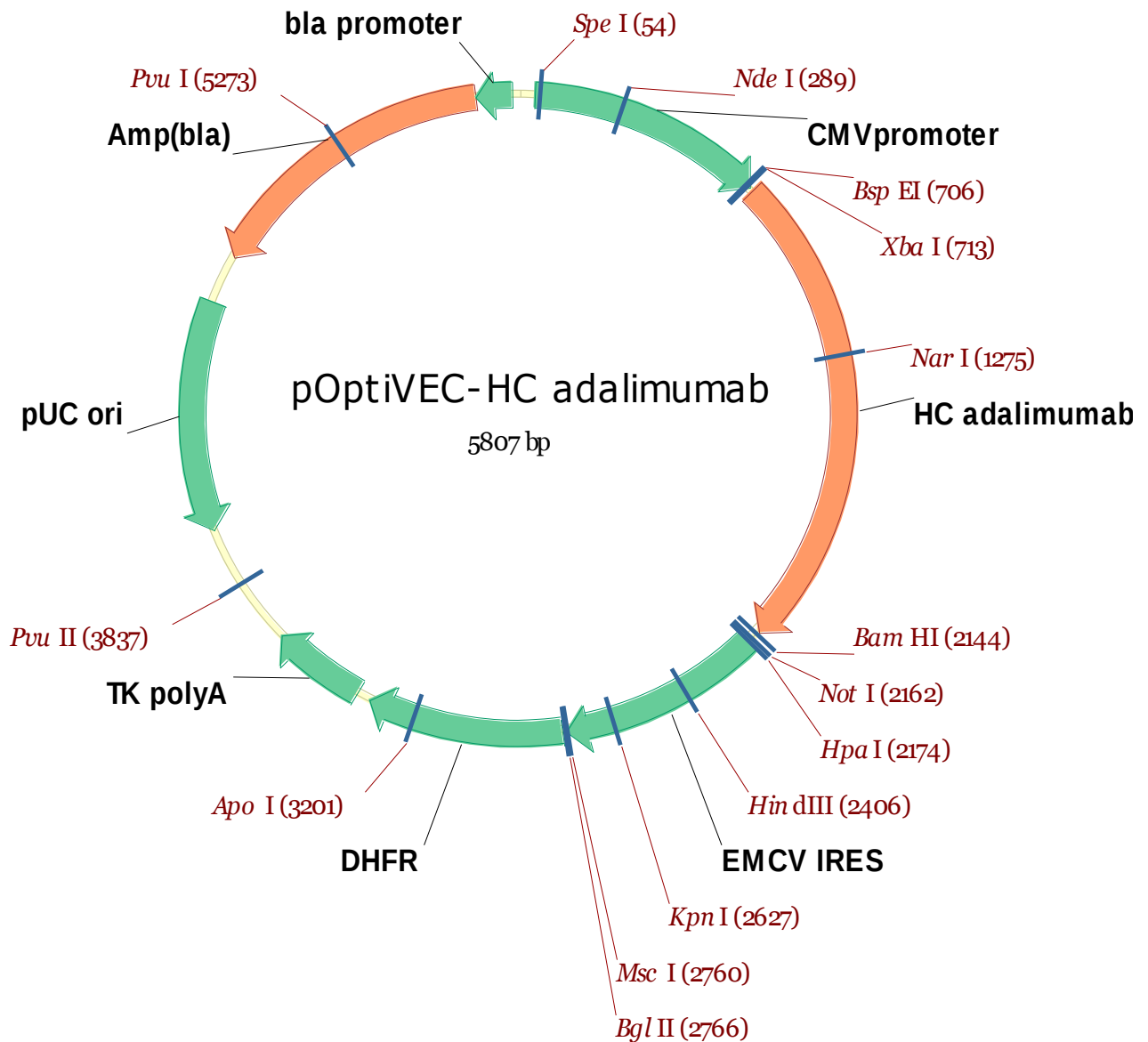


Рис. 18 Карта экспрессионного вектора *pOptiVEC- HC adalimumab*, содержащая тяжелую цепь мАТ адалимумаб

HC Adalimumab – синтетический ген тяжелой цепи мАТ адалимумаб, оптимизированный по кодонному составу,

CMV promoter – промотор предраннего гена человеческого цитомегаловируса HCMV IE1,

EMCV IRES – IRES элемент из вируса энцефаломиокардита (EMCV),

DHFR – ген дегидрофолатредуктазы

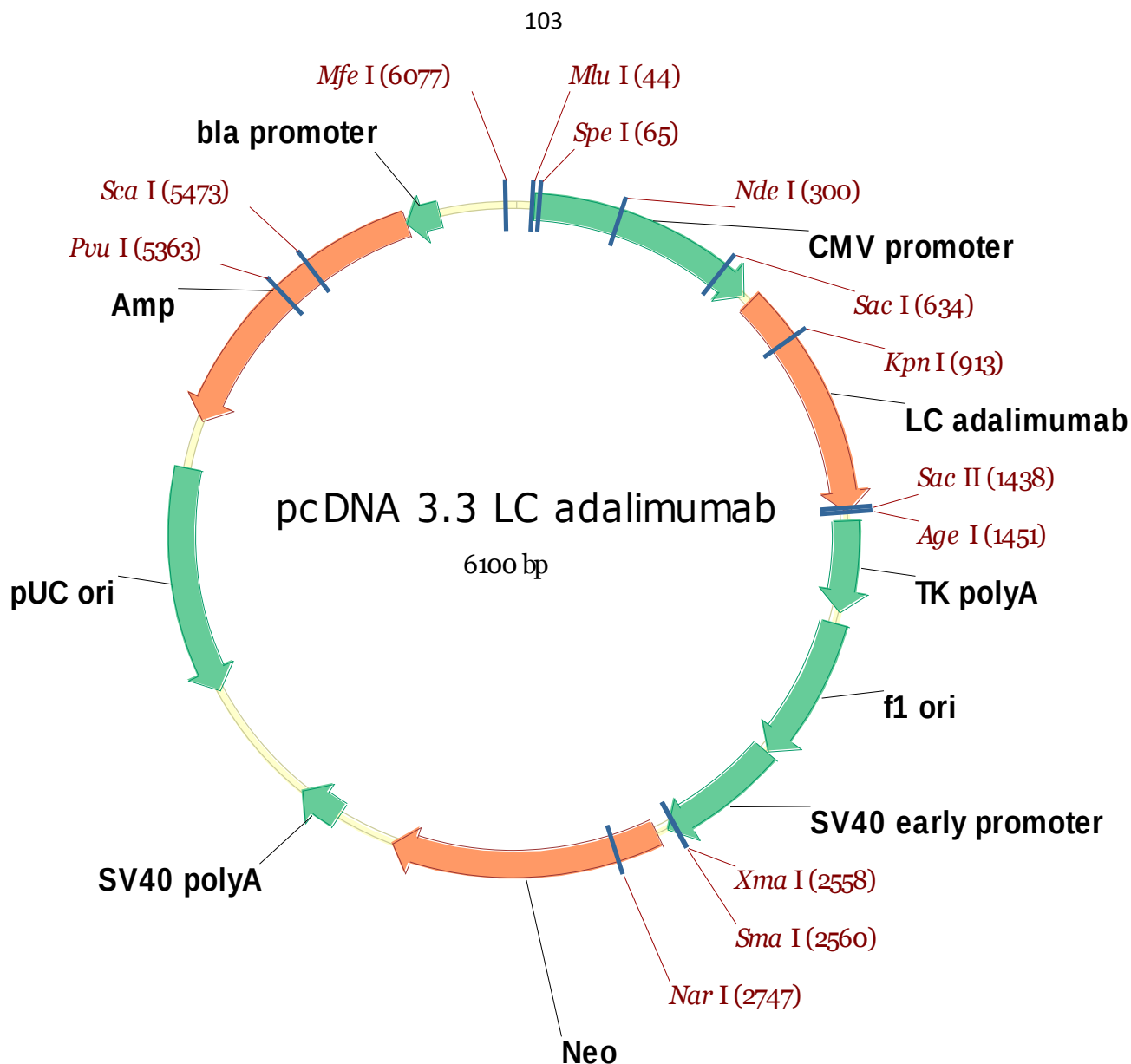


Рис. 19 Карта экспрессионного вектора *pcDNA-LC adalimumab*, содержащая легкую цепь МАТ адалимумаб

LC adalimumab – синтетический ген тяжелой цепи МАТ адалимумаб, оптимизированный по кодонному составу,

CMV promoter – промотор предраннего гена человеческого цитомегаловируса HCMV IE1,

Neo – ген неомифосфотрансферазы

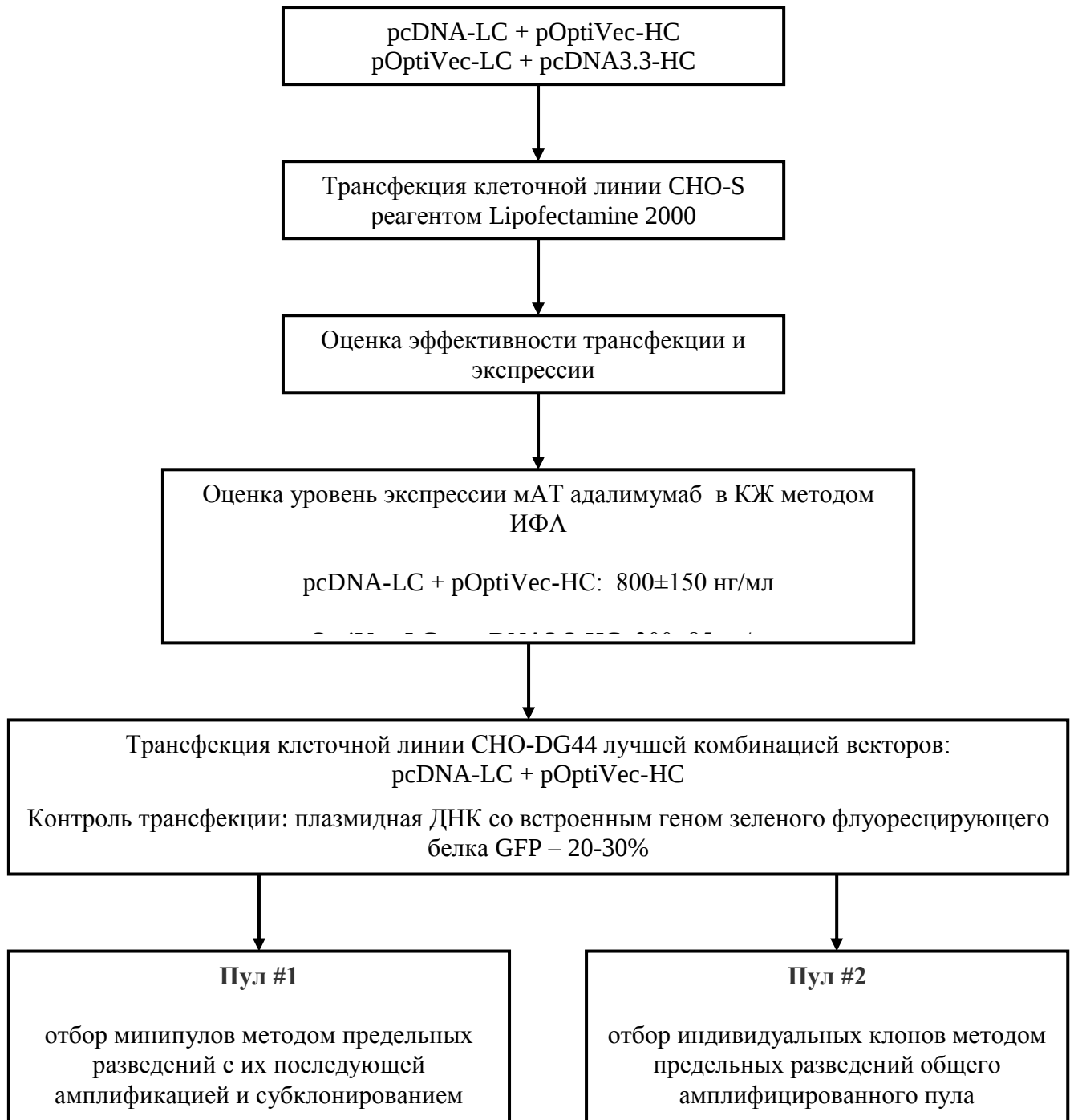


Схема 1 – Последовательность этапов получения пулов трансфицированных клеток CHO-DG44 для последующего отбора клонов

3.2.1.2. Отбор индивидуальных минипулов методом предельных разведений с последующей амплификацией и субклонированием

В результате селекции минипулов на следующий день после трансфекции методом предельных разведений рост клеточных колоний был обнаружен в 10% лунок для использованного разведения 100 клеток/лунку (1000 клеток/мл), в 25% лунок – для разведения 500 клеток/лунку (5000 клеток/мл), в 60% лунок – для разведения 1000 клеток/лунку (10000 клеток/мл).

В рамках настоящей работы в условиях селекции минипулы/клоны сравнивали именно по показателям удельной продуктивности на клетку – pcd (пг/клетку/день), так как сравнение общей продуктивности в КЖ на последний день, например, в коротких циклах культивирования, является неточным. Это обусловлено тем, что в зависимости от места интеграции гена интереса варьируется уровень экспрессии целевого белка, что влечет за собой также и изменение ростовых свойств культуры клеток. Таким образом, можно наблюдать высокую скорость роста наряду с низким общим уровнем экспрессии, и наоборот. В связи с этим, рассматривая именно удельную продуктивность на клетку, можно получить вполне адекватную (выравненную) оценку каждого минипула/клона, чтобы выбрать наиболее перспективного кандидата.

В результате селекции методом предельных разведений минипулы, обладающие максимальным уровнем удельной продуктивности, масштабировали и адаптировали к культивированию при перемешивании в колбах малого объема. На этом этапе удалось получить 10 перспективных минипулов, которые подвергли амплификации под действием МТХ, а затем субклонировали для получения индивидуальных клонов-продуцентов.

В конечном итоге, после субклонирования амплифицированных минипулов получили 27 клонов с удельной продуктивностью от 9 до 73 пг/клетку/день (табл. 7), из которых выбрали 13 перспективных (табл. 7, выделены желтым цветом) для исследований на стабильность.

Таблица 7 – Характеристика лучших субклонов после масштабирования и адаптации к культивированию в колбах Эрленмейера при перемешивании в течение 4 суток

№ п/п	№ клона	0й день культивирования		3й день культивирования		Удельная продуктивность, пг/клетку/день
		Концентрация мАТ адалимумаб, мг/л	Число живых клеток, $\times 10^6$ клет/мл	Концентрация мАТ адалимумаб, мг/л	Число живых клеток, $\times 10^6$ клет/мл	
1	1-1	3,2 $\pm$ 0,5	0,3 $\pm$ 0,1	15,4 $\pm$ 2,3	0,9 $\pm$ 0,1	9 $\pm$ 2
3	3-1	3,4 $\pm$ 0,5	0,3 $\pm$ 0,1	21,6 $\pm$ 3,2	1,4 $\pm$ 0,2	10 $\pm$ 3
4	2-2	5,2 $\pm$ 0,8	0,3 $\pm$ 0,1	30,3 $\pm$ 4,5	1,5 $\pm$ 0,2	13 $\pm$ 2
5	4-2	6,6 $\pm$ 0,9	0,3 $\pm$ 0,1	61,1 $\pm$ 9,2	2,5 $\pm$ 0,4	20 $\pm$ 4
6	1	9,3 $\pm$ 1,4	0,3 $\pm$ 0,1	42,1 $\pm$ 6,3	0,5 $\pm$ 0,1	34 $\pm$ 6
7	2	9,1 $\pm$ 1,4	0,3 $\pm$ 0,1	62,3 $\pm$ 7,5	0,7 $\pm$ 0,1	43 $\pm$ 5
8	3	11,6 $\pm$ 1,7	0,3 $\pm$ 0,1	59,8 $\pm$ 8,4	0,8 $\pm$ 0,1	37 $\pm$ 5
9	5	11,4 $\pm$ 1,6	0,3 $\pm$ 0,1	100,3 $\pm$ 15,2	1,0 $\pm$ 0,2	60 $\pm$ 8
10	6	9,1 $\pm$ 1,3	0,3 $\pm$ 0,1	62,1 $\pm$ 9,7	0,5 $\pm$ 0,1	54 $\pm$ 7
11	7	10,0 $\pm$ 1,5	0,3 $\pm$ 0,1	62,1 $\pm$ 7,7	1,0 $\pm$ 0,1	35 $\pm$ 8
12	9	11,4 $\pm$ 1,7	0,3 $\pm$ 0,1	62,2 $\pm$ 8,3	0,8 $\pm$ 0,1	40 $\pm$ 6
13	11	11,4 $\pm$ 1,8	0,3 $\pm$ 0,1	78,8 $\pm$ 9,2	1,0 $\pm$ 0,1	44 $\pm$ 5
14	12	12,8 $\pm$ 1,9	0,3 $\pm$ 0,1	76,5 $\pm$ 11,1	1,3 $\pm$ 0,2	36 $\pm$ 6
15	14	5,6 $\pm$ 0,8	0,3 $\pm$ 0,1	78,5 $\pm$ 10,4	0,9 $\pm$ 0,1	52 $\pm$ 6
16	16	9,1 $\pm$ 1,4	0,3 $\pm$ 0,1	75,1 $\pm$ 11,3	1,2 $\pm$ 0,2	39 $\pm$ 7
17	19	8,7 $\pm$ 1,3	0,3 $\pm$ 0,1	80,0 $\pm$ 12,4	1,6 $\pm$ 0,3	36 $\pm$ 9
18	25	9,1 $\pm$ 1,4	0,3 $\pm$ 0,1	104,9 $\pm$ 15,7	1,4 $\pm$ 0,2	22 $\pm$ 2
19	30	9,1 $\pm$ 1,4	0,3 $\pm$ 0,1	78,4 $\pm$ 13,5	0,9 $\pm$ 0,1	51 $\pm$ 5
20	31	10,0 $\pm$ 1,6	0,3 $\pm$ 0,1	60,4 $\pm$ 8,9	0,9 $\pm$ 0,1	37 $\pm$ 8
21	32	11,6 $\pm$ 1,8	0,3 $\pm$ 0,1	96,6 $\pm$ 16,2	1,3 $\pm$ 0,2	49 $\pm$ 4
21	33	8,4 $\pm$ 1,3	0,3 $\pm$ 0,1	62,7 $\pm$ 3,3	1,1 $\pm$ 0,1	35 $\pm$ 3
22	35	11,4 $\pm$ 1,7	0,3 $\pm$ 0,1	106,4 $\pm$ 6,7	1,0 $\pm$ 0,1	34 $\pm$ 3
23	44	9,0 $\pm$ 1,4	0,3 $\pm$ 0,1	56,9 $\pm$ 9,4	0,9 $\pm$ 0,1	34 $\pm$ 5
24	45	6,0 $\pm$ 0,9	0,3 $\pm$ 0,1	62,4 $\pm$ 9,8	0,8 $\pm$ 0,1	43 $\pm$ 6
25	47	9,6 $\pm$ 1,5	0,3 $\pm$ 0,1	55,6 $\pm$ 8,3	0,6 $\pm$ 0,1	41 $\pm$ 7
26	49	10,3 $\pm$ 1,5	0,3 $\pm$ 0,1	92,5 $\pm$ 11,2	0,6 $\pm$ 0,1	73 $\pm$ 9
27	50	6,4 $\pm$ 0,9	0,3 $\pm$ 0,1	106,5 $\pm$ 13,2	1,2 $\pm$ 0,2	61 $\pm$ 10

*Примечание. Выбранные для дальнейшей работы клоны выделены заливкой

Анализ на стабильность уровня экспрессии целевого белка при культивировании в течение определенного срока является одним из важных этапов скрининга клонов-продуцентов в рамках разработки стабильной клеточной линии. Обычно длительность изучения стабильности укладывается в сроки, которые устанавливаются длительностью периода культивирования клона-продуцента, начиная с этапа разморозки заканчивая

культивированием в реакторе. На производстве это занимает около одного-двух месяцев. Таким образом, перед нами стояла задача осуществить культивирование выбранных клонов в течение как минимум 60 генераций (то есть около двух месяцев), учитывая, что время удвоения для СНО 20-24 ч.

Таким образом, в условиях культивирования без селективных агентов наблюдали для перспективных клонов (в табл. 7 выделены желтым цветом, рис. 20) падение удельной в среднем от 30 до 70% (рис. 20, ряд желтого цвета – значения удельной продуктивности после 60 генераций). Известно, что для продуцентов, подвергнутых амплификации, наблюдается падение удельной продуктивности после отмены добавления селективных агентов. Для стабильных клонов удельная продуктивность падает, устанавливаясь на одном определенном уровне. Для нестабильных клонов наблюдают и вовсе потерю экспрессии целевого белка.

В нашем случае выбрали клоны # 7, 45, 11, 32, 30, 6, 50, для которых отмечали падение удельной продуктивности не более 50 % и дальнейшее сохранение продуктивности при длительном культивировании (рис. 20, выделены красным).

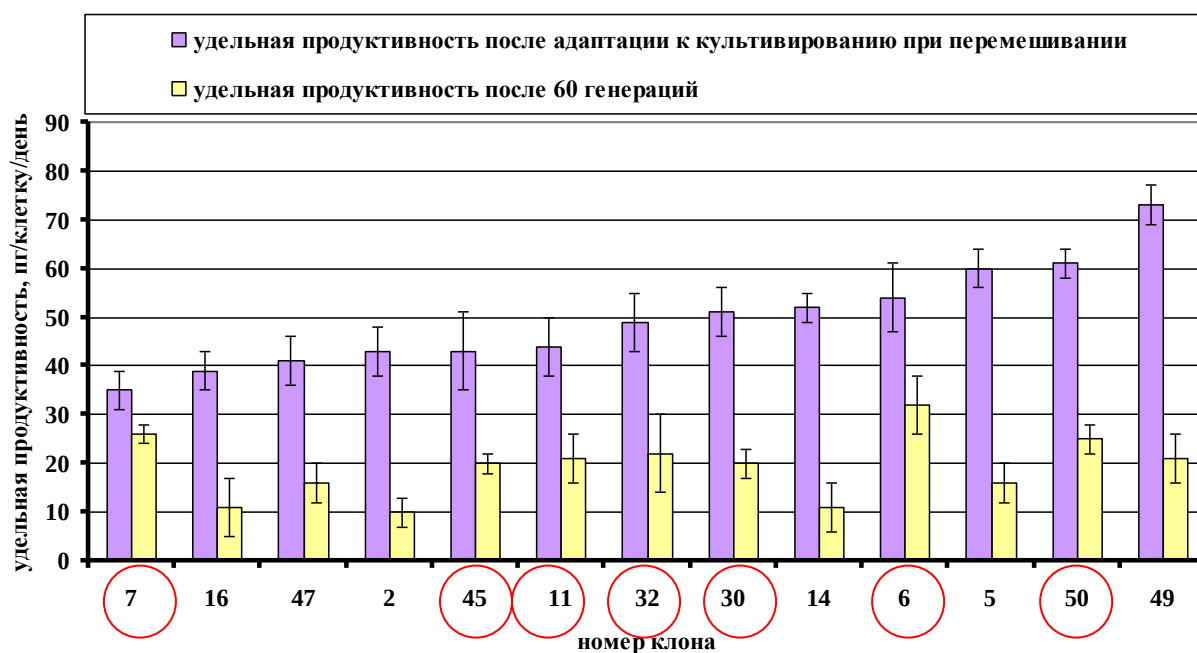


Рисунок 20 – Исследование стабильности выбранных клонов в течение 60 генераций (красным выделены стабильные клоны)

После подтверждения стабильности следующая задача на данном этапе заключалась в выявлении клона-продуцента, способного обеспечивать максимальный выход продукта в режиме длительного культивирования с периодическим добавлением подпитки fed-batch (с англ. подпитываемый, далее по тексту - цикл продукции с подпиткой) в малом объеме. Выбранный режим является наиболее распространенным в настоящее время благодаря легкости эксплуатации в производственных масштабах, валидации, обслуживания и экономической эффективности. Кроме того, молекулы антител являются стабильными в культуральной жидкости в выбранном режиме культивирования. Поэтому исследование ростовых характеристик культуры клеток и продуктивности на ранних этапах разработки клеточной линии в указанном режиме обычно является обязательным, чтобы выяснить насколько минипулы/клоны сохраняют продуктивность и ростовые характеристики при адаптации к перемешиванию и способны к длительному культивированию при высокой плотности.

Для того чтобы оценить эффективность культивирования полученных клонов-продуцентов в цикле продукции, в рамках первичного скрининга осуществили ряд экспериментов для клонов # 7, 45, 11, 32, 30, 6, 50 в наиболее часто используемой среде ActiCHO (Hyclone, США) для суспензионного культивирования в сочетании с рекомендуемой производителем к ней комплексной подпиткой ActiCHO Feed A/B (Hyclone, США).

В результате было обнаружено, что все клоны, разработанные с помощью этой стратегии, росли очень медленно (время удвоения от 40 до 50 часов) и имели склонность к агрегации. Как известно, в случае суспензионных культур, агрегация затрудняет точный подсчет жизнеспособных клеток и транспорт питательных веществ, а также продуктов из клетки [102, 115, 117, 118]. Более того, образование агрегатов существенно повлияло на ростовые характеристики, удельную скорость

пролиферации и привело к снижению жизнеспособности (данные не приведены).

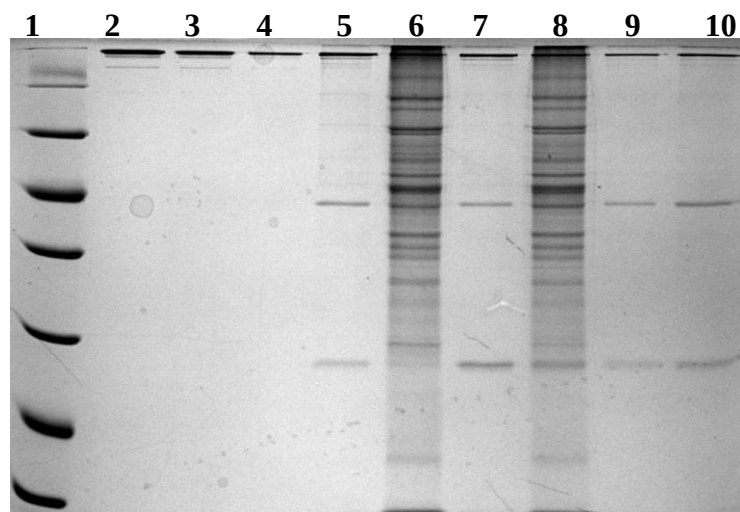
На данном этапе эта проблема была решена внесением сульфата декстрана на основе анти-клампинга в среду для культивирования (Lonza, Швейцария). Наряду с этим, после первой стадии хроматографической очистки образцов КЖ наблюдались значительные потери целевого белка и его агрегация. В лучшем случае, например, для клона #30, максимальная плотность клеток в условиях цикла продукции с подпиткой составила $(12,3 \pm 1,5) \times 10^6$ клеток/мл, в результате выход мАТ адалимумаб – всего лишь 0,4 г/л после первой стадии хроматографической очистки. В связи с этим возникло предложение, что причины низкой концентрации целевого белка в КЖ и его агрегация могут быть обусловлены несколькими факторами, например, нарушением корректности фолдинга белка в эндоплазматическом ретикулуме и процессинга сигнальных последовательностей, а также транспорта белковых молекул через аппарат Гольджи к плазматической мембране. По литературным данным известно, что вышеуказанное служит основными причинами агрегации экспрессируемых белков, что приводит к их накоплению во внутриклеточном пространстве и подавлению секреции в культуральную жидкость [102, 115, 117, 118].

Для подтверждения эффективности экспрессии мАТ адалимумаб во внеклеточное пространство исследовали образцы КЖ и супернатанта после лизиса клеток методом ЭФ по стандартной методике Лэммли в 12% геле с последующим окрашиванием Кумасси-R250, а затем осуществили секвенирование кодирующих последовательностей легкой и тяжелой цепей антитела из геномной ДНК.

Изучали образцы трех серий, полученных с разных экспериментов. Таким образом, наблюдали незначительную концентрацию антитела во внутриклеточном пространстве по сравнению с количеством белка в КЖ, что говорит об эффективной экспрессии антитела в культуральную жидкость (дорожки 6 и 8, рисунок 21). Наряду с этим, секвенирование

последовательностей, кодирующих антитело исключило вероятность ошибок в процессинге сигнальных последовательностей (данные не приведены).

А)



Б)

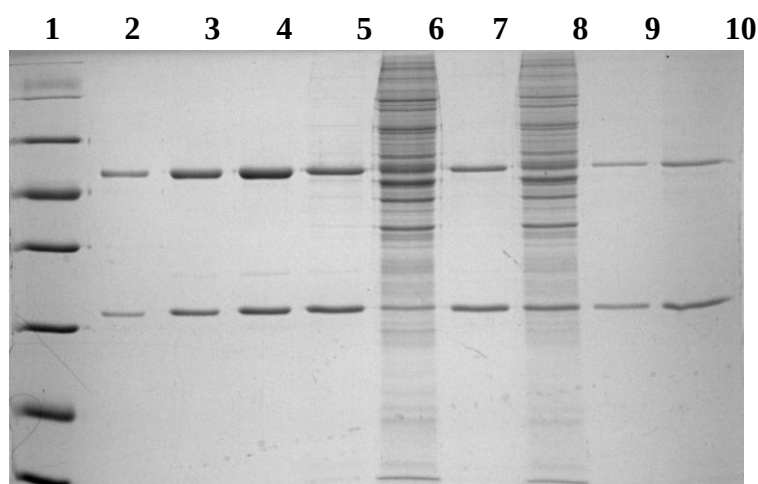


Рисунок 21 – Результаты электрофореза культуральной жидкости, полученной в цикле культивирования клона #30. Электрофорез проводился в восстанавливающих условиях в присутствии дитиотреитола (А) по стандартной методике Лэммли в 12% геле с последующим окрашиванием Кумасси-R250 и без дитиотреитола (Б)

Дорожка 1 – маркер молекулярных масс; дорожка 2, 3, 4 – стандарт Хумира (АВВОТТ, США), 0,4, 1, 1,5 мкг, соответственно; дорожка 5 – образец КЖ серии №1; дорожка 6 – лизат клеток серии №1; дорожка 7 – образец КЖ серии №2; дорожка 8 – лизат клеток серии №2; дорожка 9 – образец КЖ серии №3; дорожка 10 – образец КЖ серии №3 в присутствии 1% додецилсульфата натрия

Таким образом, по полученным результатам следовало заключить, что проблемы агрегации белка возможно были связаны с нарушением его фолдинга в эндоплазматическом ретикулуле после трансляции. Очевидно,

что решение проблемы агрегации целевого антитела во время культивирования и на стадиях выделения и очистки требовало дополнительных экспериментов. В связи с этим, чтобы исключить потерю времени на этапе создания клеточной линии-продуцента, было предложено исследовать другие клоны, полученные согласно второй стратегии.

3.2.1.3. Отбор индивидуальных клонов методом предельных разведений общего амплифицированного пула

После амплификации трансфицированного пула в селективной среде до 5 мкМ МТХ для выбора оптимальных условий селекции индивидуальных клонов-продуцентов методом предельных разведений было предложено адаптировать общий пул к линейке сред, рекомендованных производителями для суспензионного культивирования клеток CHO в системе DHFR: ActiCHO и SFM4CHO (Hyclone, США), OptiCHO (Gibco, США), Power CHO-2CD (Lonza, Швейцария) и MAM-PF77 (Amimed, Швейцария). Это позволило оценить как ростовые характеристики, так и общую продуктивность пула на разных средах и, тем самым сделать выбор оптимальных условий селекции клона-продуцента в пользу среды OptiCHO (данные не приведены).

Однако в дополнение к полученным результатам было решено осуществить эксперимент №1 – цикл продукции с подпиткой согласно схеме, представленной в таблице 8. Это позволило бы оценить общую продуктивность амплифицированного пула, чтобы понимать – каковы были шансы получить клон с продуктивностью не менее 1 г/л после селекции в неоптимизированных условиях. Комбинации сред и подпиток выбирали согласно рекомендациям производителей, а также информации из литературных источников. Таким образом, по завершении культивирования строили кривые роста (рис. 22) и методом гель-фильтрации определяли общую продуктивность мАТ адалимумаб в КЖ на последний день. Результаты эксперимента №1 так же подтвердили, что среда OptiCHO в сочетании с комплексной подпиткой ActiCHO A/B и EfficientFeed A (Gibco, США) обеспечивает максимальный выход антитела более 1 г/л по схеме # 2 и #4 (табл. 8, выделено

желтым цветом). Кроме того, на рисунке 22 видно, что именно на этой среде культура клеток достигает максимума клеточной плотности до 10 млн клеток/мл. В связи с этим, было предложено сделать окончательный выбор наиболее благоприятных условий для осуществления предельных разведений в пользу среды OptiCHO.

Так как амплификация проводилась только по генетической конструкции, содержащей тяжелую цепь антитела в условиях достаточно сильного селективного давления 5 мкМ МТХ, чтобы исключить потерю экспрессии легкой цепи перед субклонированием амплифицированного пула, было предложено проверить соотношение экспрессируемых цепей антитела, методом электрофореза по Лэммли (рис. 23). В результате получили, что легкая цепь экспрессируется в избытке. По литературным данным известно, что данный факт является предпочтительным условием для корректной экспрессии антитела в культуральную жидкость.

Таблица 8 – Эксперимент №1. Схема цикла продукции амплифицированного пула на разных средах с подпитками и полученные в результате концентрации мАТ Адалимумаб в образцах КЖ и в элюатах после первой стадии хроматографической очистки

№ колбы/схемы	Схема культивирования		Концентрация мАТ Адалимумаб в КЖ на последний день культивирования, г/л	Концентрация мАТ Адалимумаб в элюате, мг/л
	Среда	Подпитка		
1	ActiCHO SM	3,5-5% ActiCHO Feed-A/B	1,52±0,21	973±34
2	OptiCHO	5-10% EfficientFeed A	1,45±0,15	1088±56
3	Power CHO-2CD	5-10% EfficientFeed A	0,62±0,05	356±54
4	OptiCHO	3,5-5% ActiCHO Feed-A/B	1,95±0,19	1492±61
5	SFM4CHO	6% Cell Boost 2/ 4% Cell Boost 5	0,83±0,22	618±49
6	MAM-PF77	0,3-1x FMS 3	1,31±0,18	870±45

*Примечание. Подпитки вносили с 3-х суток культивирования, увеличивая процентное содержание от рабочего объема культуры клеток по мере увеличения концентрации жизнеспособных клеток и потребления. Заливкой выделены условия культивирования, по результатам которых было получено максимальное количество мАТ адалимумаб в КЖ на последний день

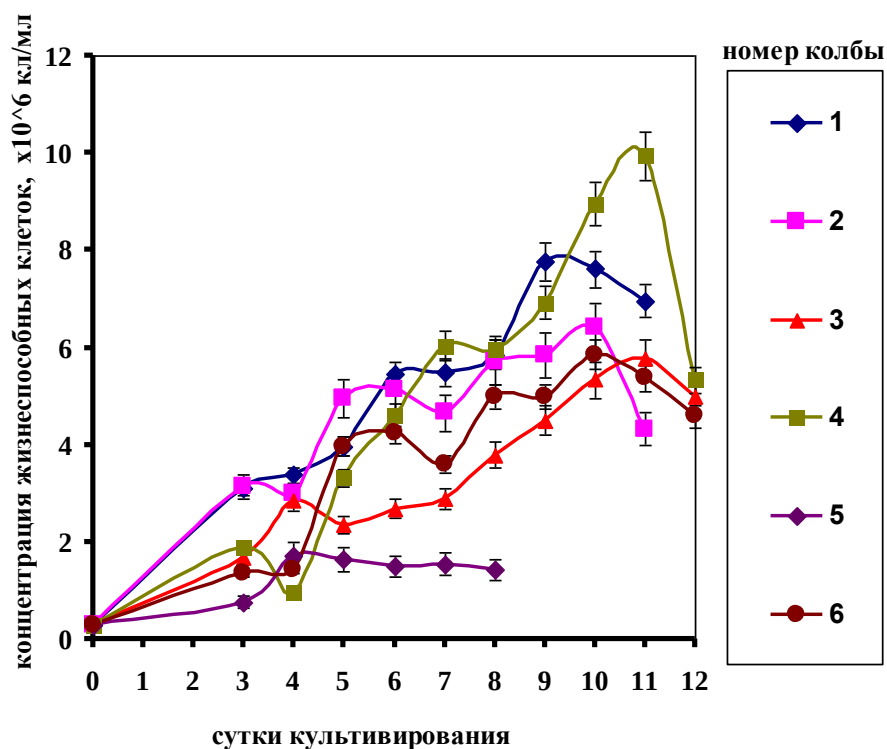


Рисунок 22 – Эксперимент №1. Кривые роста амплифицированных пулов в цикле продукции по схеме, приведенной в таблице 8

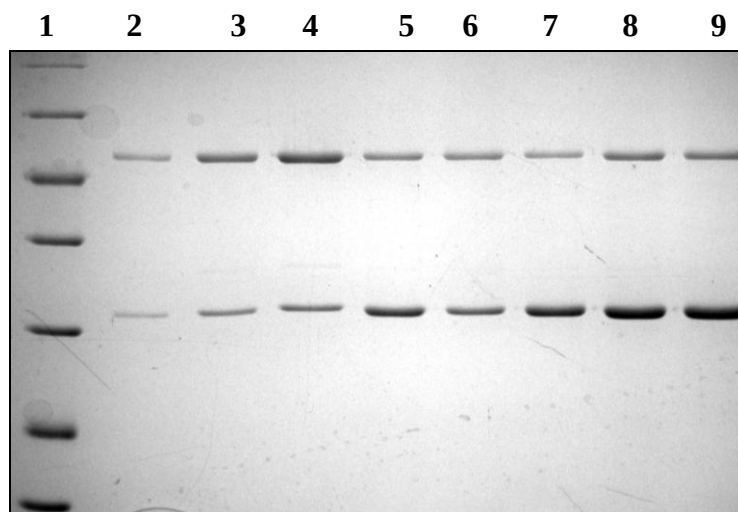


Рисунок 23 – Эксперимент №1. Результаты электрофореза культуральной жидкости, полученной в цикле культивирования амплифицированных пулов.

Электрофорез проводился в восстанавливающих условиях в присутствии дитиотреитола по стандартной методике Лэммли в 12% геле с последующим окрашиванием Кумасси-R250\

Дорожка 1 – маркер молекулярных масс; дорожка 2, 3, 4 – стандарт Хумира (АВВОТТ, США), 0,4, 1, 1,5 мкг, соответственно; дорожка 5 – образец КЖ пула №1; дорожка 6 – образец КЖ пула №2; дорожка 7 – образец КЖ пула №6; дорожка 8 – образец КЖ пула №5; дорожка 9 – образец КЖ пула №4

Предельные разведения амплифицированных пулов осуществляли в 96-луночных планшетах OptiCHO в концентрации 0,5 клетки на лунку. После

трудоёмкой селекции в 96- и 24-луночных планшетах на этапе культивирования в 6-луночных планшетах получили 40 перспективных клонов-продуцентов (табл. 9). Полученные значения удельной продуктивности варьировались от 7 до 35 пг/клетку/день. Согласно полученным результатам для адаптации к культивированию в колбах при перемешивании выбрали клоны (табл. 9, выделены желтым цветом), удельная продуктивности которых была не менее 20 пг/клетку/день.

Для того, чтобы сократить количество исследуемых кандидатов (табл. 9, выделены желтым цветом) на данном этапе было предложено осуществить Эксперимент №2 – цикл продукции в среде ActiCHO в сочетании с комплексной подпиткой ActiCHO A/B.

Этот этап селекции был основан на сравнении клонов по ряду параметров:

- максимально достигнутой клеточной плотности за цикл культивирования;
- общего количества клеток за весь цикл;
- общему выходу мАТ адалимумаб в культуральной жидкости;
- концентрации мАТ адалимумаб в аффинном элюате после первой стадии хроматографической очистки;
- длительности процесса культивирования.

Эксперимент №2 повторили через несколько пассажей культивирования для подтверждения полученных результатов. На основании итоговой оценки полученных данных (табл. 10 и рис. 24, средние результаты Эксперимента №2 в двух повторностях) выбрали образцы КЖ клонов #1, 6, 22, 23, 26, 38, 39 с максимальным количеством мАТ адалимумаб на последний день культивирования (рис. 24, сиреневый ряд) и подвергли хроматографической очистке.

Таким образом, в элюатах клонов # 6, 22, 26, 38, 39 получили выход более 1 г/л (рис. 24, ряд желтого цвета).

Таблица 9 – Результаты исследования удельной продуктивности лидирующих клонов после адаптации к 6-ти луночным планшетам в коротком цикле продукции

№ клон а	0 день культивирования		3й день культивирования		Удельная продуктивнос ть, пг/клетку/ден ь
	Концентрация мАТ Адалимуаб, мг/л	Число живых клеток, ×10 ⁶ клеток/ мл	Концентрация мАТ Адалимуаб, мг/л	Число живых клеток, ×10 ⁶ клеток/ мл	
1	1,5±0,3	99	1,3±0,1	39	24±1
2	1,1±0,2	93	1,0±0,1	86	10±1
3	0,6±0,1	97	1,6±0,1	95	29±1
4	0,7±0,1	96	1,9±0,1	96	35±2
5	1,2±0,2	64	2,3±0,1	26	7±1
6	1,2±0,2	96	1,1±0,1	99	28±1
7	0,9±0,2	96	1,7±0,1	97	21±1
8	1,0±0,2	97	1,2±0,1	98	24±1
9	0,6±0,1	94	1,6±0,1	93	22±1
10	0,5±0,2	99	2,2±0,1	98	22±1
11	0,7±0,1	94	1,5±0,1	97	25±1
12	0,7±0,1	97	1,5±0,1	98	24±2
13	0,6±0,2	93	1,5±0,1	93	34±1
14	0,4±0,1	94	0,5±0,1	97	22±1
15	1,0±0,2	95	1,3±0,1	96	14±1
16	0,9±0,2	95	1,5±0,1	94	14±1
17	0,7±0,2	98	1,1±0,1	95	17±1
18	0,8±0,2	96	2,1±0,1	96	27±1
19	1,0±0,2	96	1,7±0,1	95	16±2
20	0,9±0,3	97	0,8±0,1	92	20±1
21	1,0±0,2	98	1,1±0,1	97	16±2
22	1,5±0,1	96	1,3±0,1	96	27±1
23	0,5±0,2	95	1,5±0,1	94	33±2
24	0,9±0,2	98	1,2±0,1	95	12±2
25	1,4±0,1	96	1,4±0,1	95	32±2
26	1,0±0,2	96	1,7±0,1	97	33±1
27	1,1±0,2	74	1,3±0,1	90	10±1
28	0,3±0,1	89	1,7±0,1	92	42±1
29	0,3±0,2	93	1,3±0,1	94	29±3
30	0,8±0,2	97	1,1±0,1	95	18±1
31	0,8±0,2	93	2,1±0,1	96	12±2
32	1,4±0,1	91	1,5±0,1	95	10±2
33	0,3±0,2	94	0,8±0,1	96	18±2
34	0,8±0,2	97	1,9±0,1	98	27±1
35	1,2±0,2	93	2,2±0,1	97	18±2
36	0,6±0,1	98	2,5±0,1	99	25±3
37	1,7±0,1	98	2,0±0,1	95	21±1
38	1,3±0,2	94	1,3±0,1	97	24±2
39	1,2±0,1	93	1,9±0,1	94	31±1
40	0,4±0,1	80	1,5±0,1	97	28±1

*Примечание. Перспективные клоны для исследования на стабильность выделены заливкой.

Таблица 10 – Эксперимент №2. Результаты исследования лидирующих клонов при длительном культивировании в цикле продукции в среде ActiCHO P с комплексной подпиткой ActiCHO A/B

№ п/п	# клона	Максимум клеточной плотности, млн кл/мл	Общее количество клеток, млн кл/мл (среднее)	Концентрация мАТ Адалимуаб в КЖ на последний день, г/л	Длительность, дни	Жизнеспособность на последний день, %
1	1	10,40±2,11	68,96	1,85±0,19	13	65
2	3	8,53±0,54	53,95	1,63±0,14	14	78
3	4	5,10±0,35	31,40	0,96±0,11	13	65
4	6	10,50±1,51	64,71	1,93±0,21	13	67
5	8	8,73±1,56	60,04	1,72±0,18	14	68
6	11	6,61±1,21	38,88	0,74±0,08	12	72
7	12	7,17±0,75	53,12	1,54±0,16	14	74
8	13	4,51±0,33	26,84	0,68±0,07	12	83
9	18	10,01±1,23	60,04	1,36±0,15	14	76
10	22	11,30±1,68	83	2,53±0,24	14	68
11	23	6,48±1,07	48,55	1,86±0,15	14	69
12	25	3,08±1,41	10,08	0,65±0,05	10	71
13	26	16,20±1,34	113,1	2,23±0,23	14	69
14	28	6,29±2,11	31,71	0,77±0,09	10	70
15	29	6,10±1,16	39,62	0,71±0,08	13	73
16	34	8,44±0,97	53,39	1,29±0,13	14	64
17	36	6,73±0,35	37,03	0,82±0,08	12	74
18	38	16,00±1,74	86,59	1,86±0,29	13	67
19	39	8,04±0,84	56,92	1,84±0,17	14	70
20	40	6,91±1,12	35,79	0,57±0,06	11	69

*Примечание. Перспективные клоны для исследования на стабильность выделены заливкой.

Благодаря полученным результатам в Эксперименте №2 на данном этапе удалось сократить количество клонов почти в три раза и выбрать наиболее перспективные: #1, 6, 22, 23, 26, 38, 39. Они отличались максимально достигнутой клеточной плотностью в условиях длительного культивирования с подпиткой – $(7-18) \times 10^6$ клеток/мл, общим выходом мАТ адалимуаб в КЖ – 1,2-2,6 г/л, а также наиболее продолжительным циклом культивирования – от 13 до 14 дней. В связи с этим было предложено исследовать эти клоны-продуценты на стабильность экспрессии мАТ адалимуаб в течение 60 генераций на среде ActiCHO.

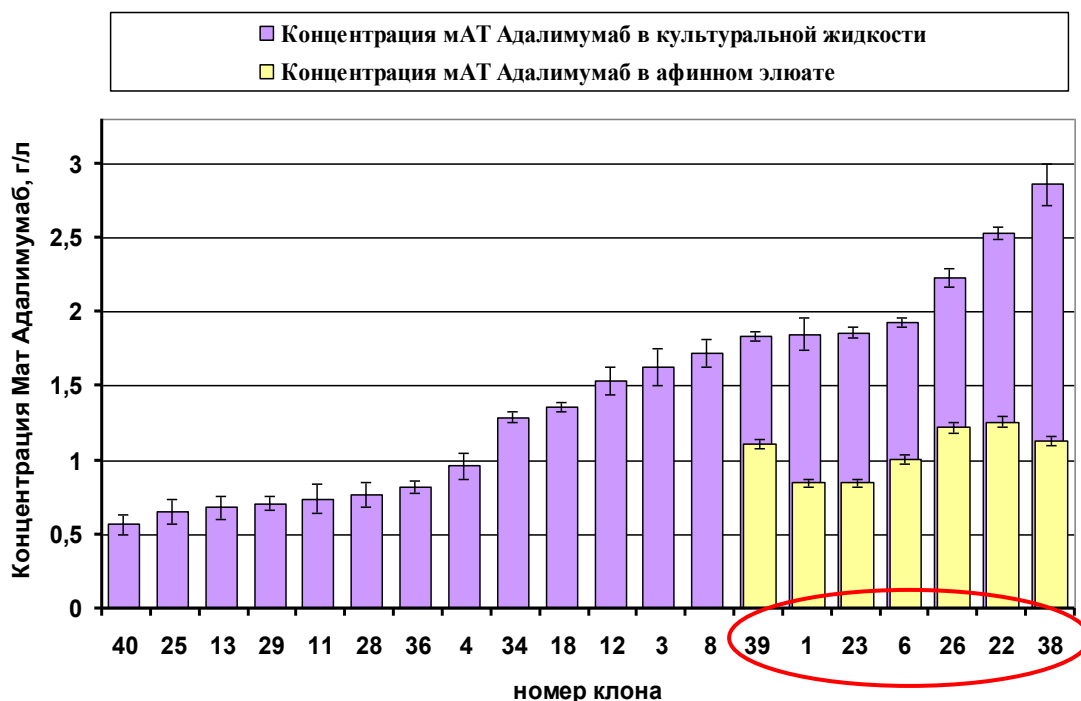


Рисунок 24 – Эксперимент №2. Общая продуктивность клонов в КЖ на последний день, полученная в результате длительного культивирования в цикле продукции в среде ActiCHO с комплексной подпиткой ActiCHO A/B (сиреневый ряд – концентрация продукта в КЖ, желтый – концентрация в элюате после первой стадии хроматографической очистки)

Для клонов #1, 6, 22, 23, 26, 38, 39 осуществляли короткие циклы продукции в течение двух месяцев наряду с контролем количества жизнеспособных клеток и концентрации мАТ адалимумаб в КЖ на последний день культивирования методом ИФА (Эксперимент №3).

По полученным результатам в Эксперименте №3 рассчитали удельную продуктивность для каждого клона по двум точкам (рис. 25): первая точка удельная продуктивности клонов-продуцентов после адаптации к культивированию при перемешивании в колбах, вторая точка – значения удельной продуктивности после 60 генераций.

Падение удельной продуктивности при культивировании без селективных антибиотиков наблюдали для выбранных клонов в среднем до 70-80%.

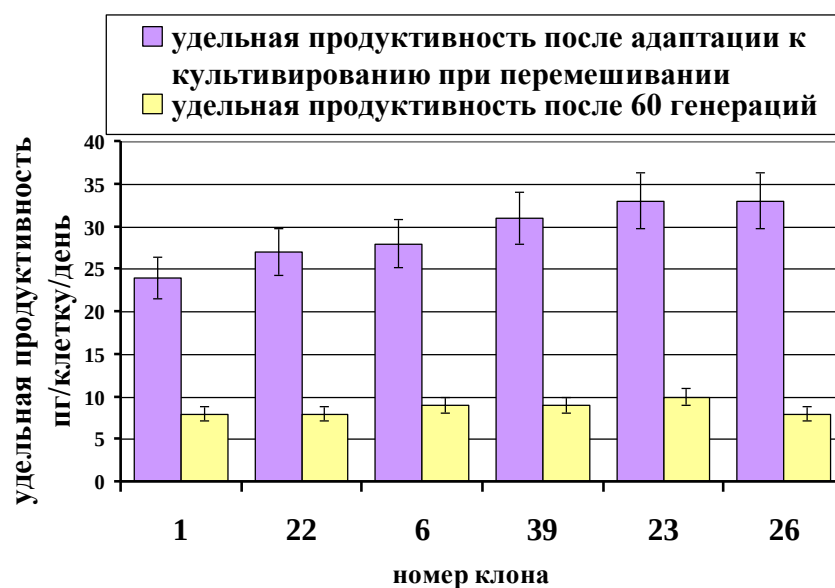


Рисунок 25 – Эксперимент №3. Исследование стабильности выбранных клонов в течение 60 генераций

Кроме того, образцы КЖ, полученных в Эксперименте №3, исследовали методом ЭФ по стандартной методике Лэммли в 12% геле с последующим окрашиванием Кумасси-R250 для подтверждения правильного соотношения экспрессии тяжелой и легкой цепей (рис. 26) в сравнении с оригинальным препаратом. Таким образом, подтвердили, что легкая цепь экспрессируется в избытке, что является положительной предпосылкой исследовать все выбранные клоны-продуценты в следующих экспериментах.

Анализируя полученные данные по стабильности исследуемых конов-продуцентов важно отметить, что в течение двух месяцев культивирования при снижении удельной продуктивности наблюдали увеличение скорости роста и уменьшение времени удвоения (данные не приведены). После 60 генераций уровень экспрессии мАТ адалимумаб стабилизировался для выбранных клонов в среднем 6-10 пг/клетку/день (рис. 25) в условиях коротких циклов продукции на среде ActiCHO и выбрать конкретный для дальнейшей работы было затруднительно.

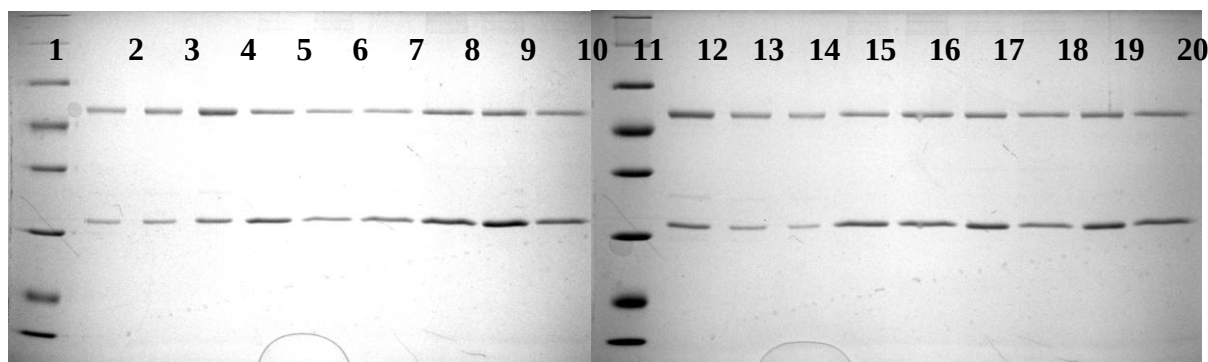


Рисунок 26 – Эксперимент №3. Результаты электрофореза культуральной жидкости, полученной в цикле культивирования амплифицированных пулов. Электрофорез проводился в восстанавливающих условиях в присутствии дитиотреитола по стандартной методике Лэммли в 12% геле с последующим окрашиванием Кумасси-R250. Образцы КЖ клонов нанесены последовательно – после адаптации к культивированию при перемешивании и после 60 генераций

Дорожка 1 – маркер молекулярных масс; дорожка 2, 3, 4 – стандарт Хумира (АВБОТТ, США), 0,4, 0,5, 1 мкг, соответственно; дорожка 5, 6 – образец КЖ клона #23; дорожка 7, 8 – образец КЖ клона #26; дорожка 9, 10 – образец КЖ клона #39; Дорожка 11 – маркер молекулярных масс; дорожка 12, 13, 14 – стандарт Хумира (АВБОТТ, США), 0,4, 0,5, 1 мкг, соответственно; дорожка 15, 16 – образец КЖ клона #1; дорожка 17, 18 – образец КЖ клона #6; дорожка 19, 20 – образец КЖ клона #22

В связи с этим на данном этапе, благодаря доступному разнообразию коммерческих сред, рекомендуемых производителями для суспензионного культивирования клеток СНО, следующая задача заключалась в использовании возможности адаптировать клоны-продуценты на линейку сред и сравнить их ростовые характеристики и продуктивность, как в коротких циклах продукции, так и в рамках длительного культивирования с подпитками, и, таким образом, выбрать клон-продуцент, который будет обеспечивать максимально возможное количество продукта за цикл культивирования.

3.2.1.4. Выбор клона с максимальной продуктивностью

Клоны-продуценты, выбранные на предыдущем этапе #1, 6, 22, 23, 26, 38, 39 адаптировали к культивированию на средах BalanCD Growth A (Irvine

Scientific, США), SFM4CHO и Hyclone (Hyclone, США), Cellvento210 (Merck, Германия), которые рекомендованы производителями для супсензионного культивирования клеток CHO и успешно применяются в биофармацевтическом производстве моноклональных антител.

Пассирование культуры клеток на разных средах осуществляли в рамках Эксперимента №4 в течение четырех недель (8-ми пассажей). На каждом пассаже определяли концентрацию жизнеспособных клеток и моноклонального антитела на 4-ый день культивирования. По результатам эксперимента рассчитывали скорость роста, время удвоения, удельную продуктивность и проводили сравнительную оценку (рис. 27).

На рисунке видно, что распределение значений, полученных в условиях культивирования на среде ActiCHO, находятся в пределах от 7 до 10, в случае SFM4CHO максимальное среднее значение было получено около 15 пг/клетку/день для клона #26. Кроме того, следует отметить сравнительно высокую эффективность культивирования клонов на среде Cellvento210 в некоторых случаях (рис.27, клоны #26, 23).

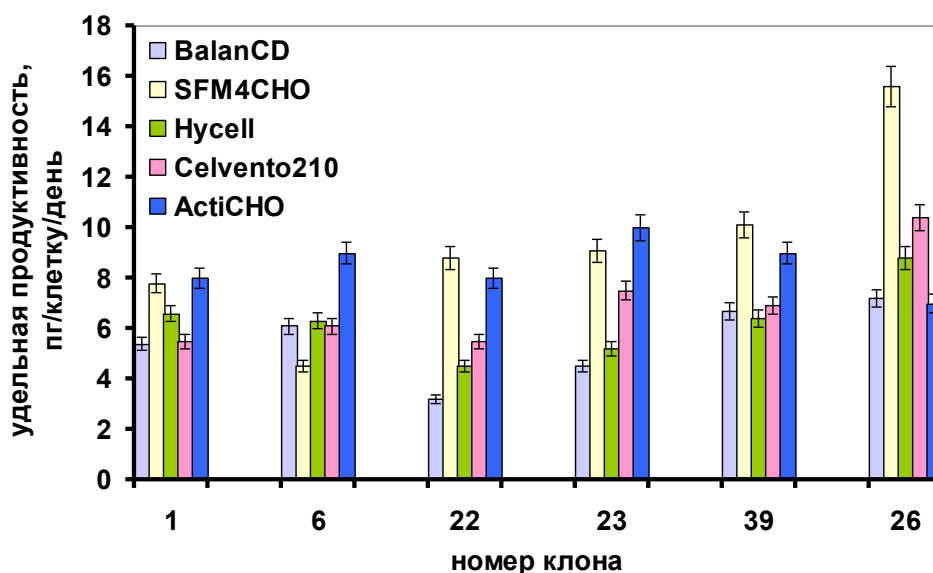


Рисунок 27 – Эксперимент №4. Удельная продуктивность клонов на разных средах

Таким образом, было показано, что среды ActiCHO и SFM4CHO в коротких циклах продукции обеспечивают высокую скорость роста и

максимальное количество антитела в КЖ на последний день для всех выбранных клонов (данные не приведены). Наряду с этим, по результатам эксперимента клон #26 явно отличался более высокими значениями удельной продуктивности от других кандидатов исследуемой группы. Следует отметить, клон #38 был исключен из эксперимента по причине склонности к сильной агрегации клеток во время культивирования, что затрудняло подсчет клеток, оказывало сильное влияние на ростовые характеристики, что, в конечном счете сказывалось и на продуктивности в худшую сторону.

На следующем этапе было предложено провести два эксперимента (Эксперименты №5 и №6) на средах ActiCHO и SFM4CHO в условиях длительного культивирования с подпиткой и сравнить клоны по общей продуктивности и максимально достигнутой клеточной плотности.

По результатам Эксперимента №5 – цикла продукции клонов #1, 6, 22, 23, 26, 39 в среде ActiCHO с комплексной подпиткой ActiA/B, максимальная клеточная плотность около 40 млн кл/мл (рис. 28) была отмечена на 13-й день культивирования в случае клона #26, что является феноменальным в рамках культивирования в колбах малого объема.

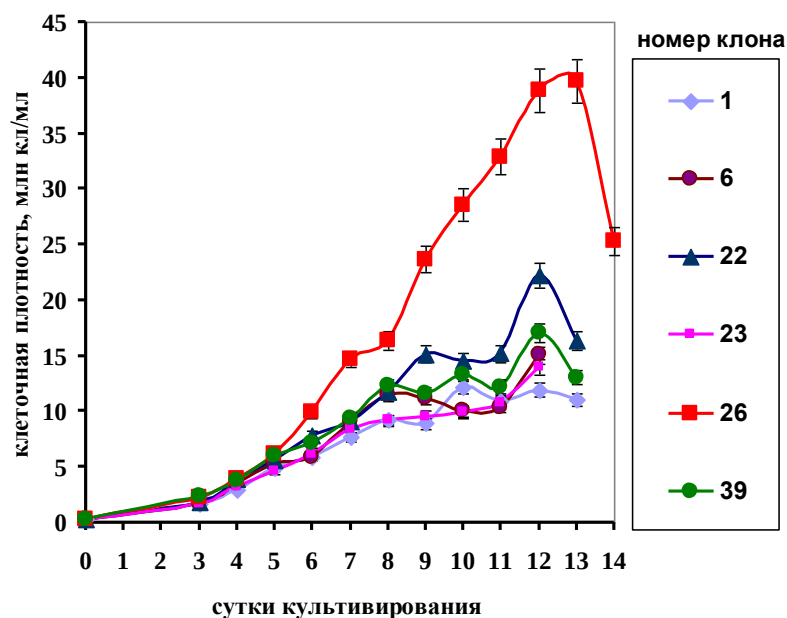


Рисунок 28 – Эксперимент №5. Кривые роста клонов, полученные в цикле продукции в среде ActiCHO с комплексной подпиткой ActiA/B

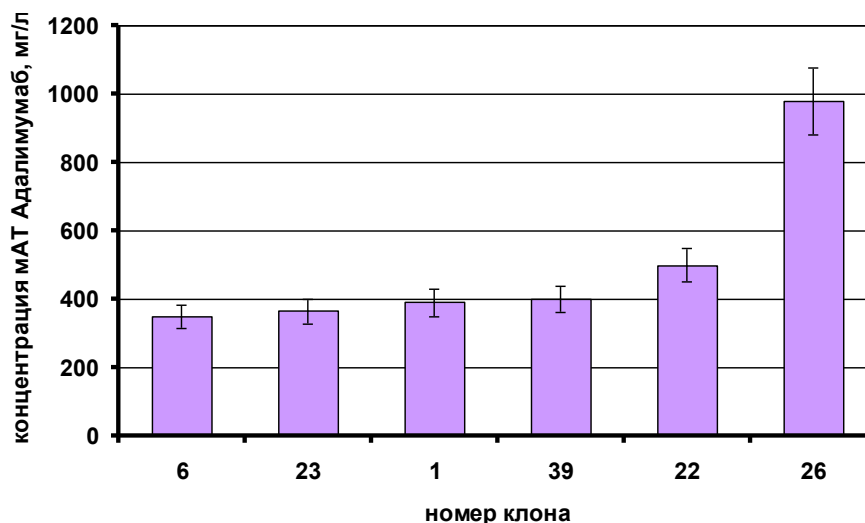


Рисунок 29 – Эксперимент №5. Продуктивность клонов в культуральной жидкости на последний день культивирования в цикле продукции в среде ActiCHO с подпиткой ActiA/B

Следует отметить, что получение таких клонов-продуцентов с достаточно высокой скоростью роста довольно редкое событие по литературным данным, ввиду того, что клеточные линии на основе CHO обычно в цикле продукции с подпиткой достигают максимума 20-30 млн клеток/мл. Наряду с этим, по результатам ИФА продуктивность на последний день культивирования составила около 1 г/л для клона #26 (рис. 29), что являлось максимальным в этом эксперименте. Для остальных клонов продуктивность оказалась в два раза ниже.

В эксперименте №6 – цикле продукции с подпиткой на среде SFM4CHO, было предложено исследовать только клоны # 22, 23, 26 и 39, исходя из результатов по удельной продуктивности полученных ранее (рис. 27). Выбор схемы эксперимента (табл. 11) был обусловлен в первую очередь рекомендациями производителя SFM4CHO с подпитками CellBoost 2/4 и 4/5, ActiCHO A/B, а так же положительными результатами (полученными ранее в других экспериментах) использования сочетания среды SFM4CHO с комплексной подпиткой FMS3 другого производителя.

Таблица 11 – Эксперимент №6. Схема цикла продукции на среде SFM4CHO с подпитками

№ колбы	Схема культивирования		
	Номер клона	Среда	Подпитка
1	22	SFM4CHO	4-7% Cell Boost 2 / 4-7% Cell Boost 4
2	23		
3	39		
4	22		4-7% Cell Boost 2 / 4-7% Cell Boost 5
5	23		
6	39		
7	26		1-1,5% ActiCHO Feed-A/B
8	26		0,3-0,5xFMS3
9	26		

*Примечание. Подпитки вносили с 3-х суток культивирования, увеличивая процентное содержание от рабочего объема культивирования по мере увеличения концентрации жизнеспособных клеток

Согласно полученным данным в Эксперименте №5 (табл. 11, рис. 30-31) явным лидером по максимально достигнутой клеточной плотности, и, соответственно, по общему количеству клеток являлся клон #26 (рис. 30), что в 2-3 раза было выше, чем в случае клонов # 22, 23 и 39. Наибольшее количество антитела в КЖ на последний день культивирования по данным ИФА было получено в среднем 0,8 и 0,9 г/л (рис. 31) для клонов #22 и 26, соответственно.

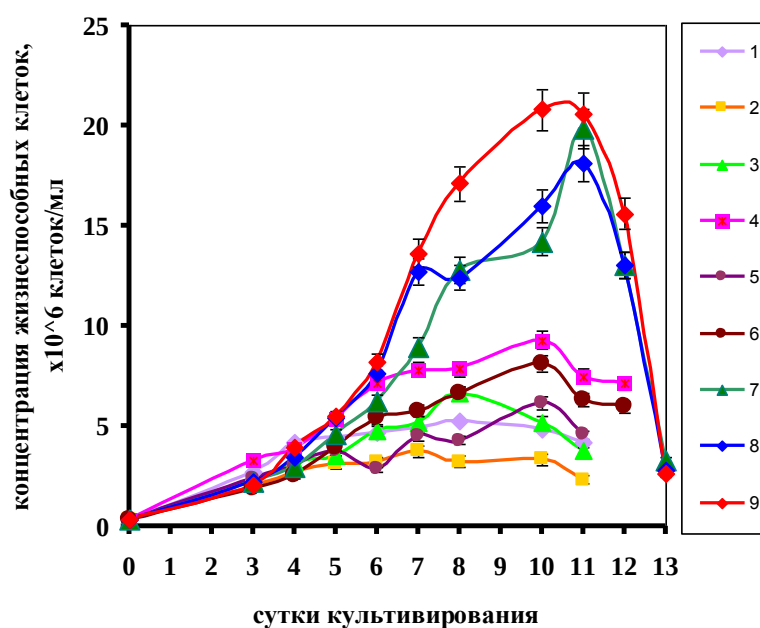


Рисунок 30 – Эксперимент №6. Кривые роста клонов, полученные в результате цикла продукции на среде SFM4CHO с разными подпитками согласно схеме, приведенной в таблице 11

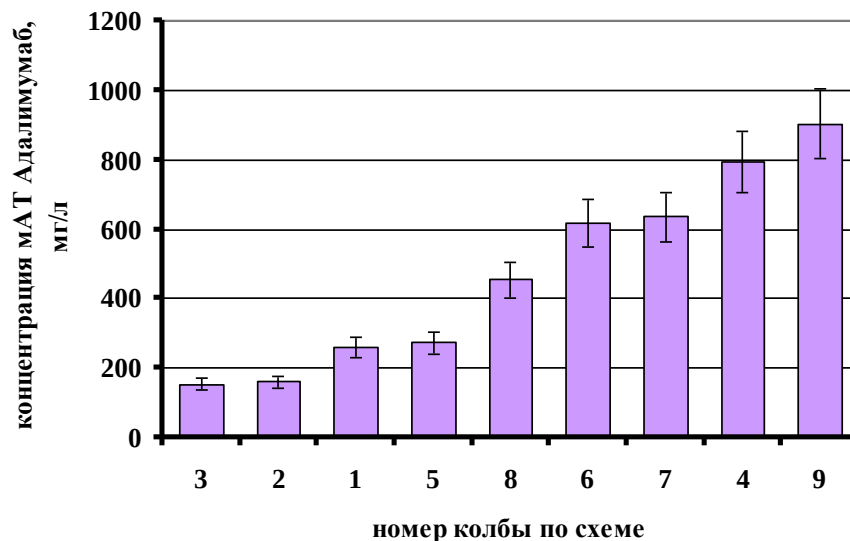


Рисунок 31 – Эксперимент №6. Продуктивность клонов # 22, 23, 26, 39 в КЖ на последний день культивирования в цикле продукции с подпиткой согласно схеме, представленной в таблице № 11

Интересно, что максимальная клеточная плотность около 20 млн кл/мл, полученная в случае клона #26 по схеме SFM4CHO/FMS3 на 10-11 день (рис. 30), в 2 раза меньше, чем в случае культивирования на среде ActiCHO с комплексной подпиткой ActiA/B (Эксперимент №5, рис. 28). Такая разница в максимумах клеточной плотности для одного клона на разных по составу средах наряду с одинаковой общей продуктивностью, очевидно, объясняется тем, что удельная продуктивность клона #26 на средах ActiCHO и SFM4CHO (рис. 27) в ранее проведенном эксперименте различалась практически в 2 раза.

Важно отметить, что использование сочетания сред и подпиток разных производителей оказалось более эффективным, нежели их применение в рамках одного производителя. Кроме того, по результатам экспериментов на этапе выбора наиболее высокопродуктивного клона было показано, как важно осуществлять сравнительную оценку клонов не только в рамках культивирования на средах разного состава и производителей, но и в условиях длительных циклов культивирования с подпиткой.

Сравнивая результаты Экспериментов №4-6 можно заключить, что, несмотря на довольно низкое значение удельной продуктивности около 5 пг/клетку/день на среде ActiCHO (Эксперимент №3, рис. 25), клон #26 отличался в экспериментах на других

средах способностью расти в условиях очень высокой плотности в рамках длительного культивирования с подпиткой и обеспечивать количество мАТ Адалиумаб около 1 г/л.

Таким образом, среди огромного количества клонов-продуцентов был отобран один – клон #26, обладающий наилучшими ростовыми характеристиками и уровнем экспрессии. Результаты сравнительной оценки позволили выбрать клон №26 в качестве клеточной линии, стабильность экспрессии которого была подтверждена в течение как минимум 2 месяцев культивирования. Было показано, что выбранный продуцент обеспечивает максимальное количество мАТ адалиумаб в культуральной жидкости по сравнению с другими, что послужило положительной предпосылкой для дальнейшей оптимизации условий культивирования в целях улучшения метаболизма, ростовых характеристик и общей продуктивности клеточной линии на основе продуцента #26. Иллюстрация последовательности этапов получения клональных клеточных линий по двум стратегиям представлена на схеме 2. На данном этапе был создан рабочий банк клеточной линии CHO-DHFR-ADMB26 для дальнейших исследований в условиях оптимизации и масштабирования. Следующая задача заключалась в выборе оптимальных условий культивирования для обеспечения максимального количества и качества продукта в малом объеме.

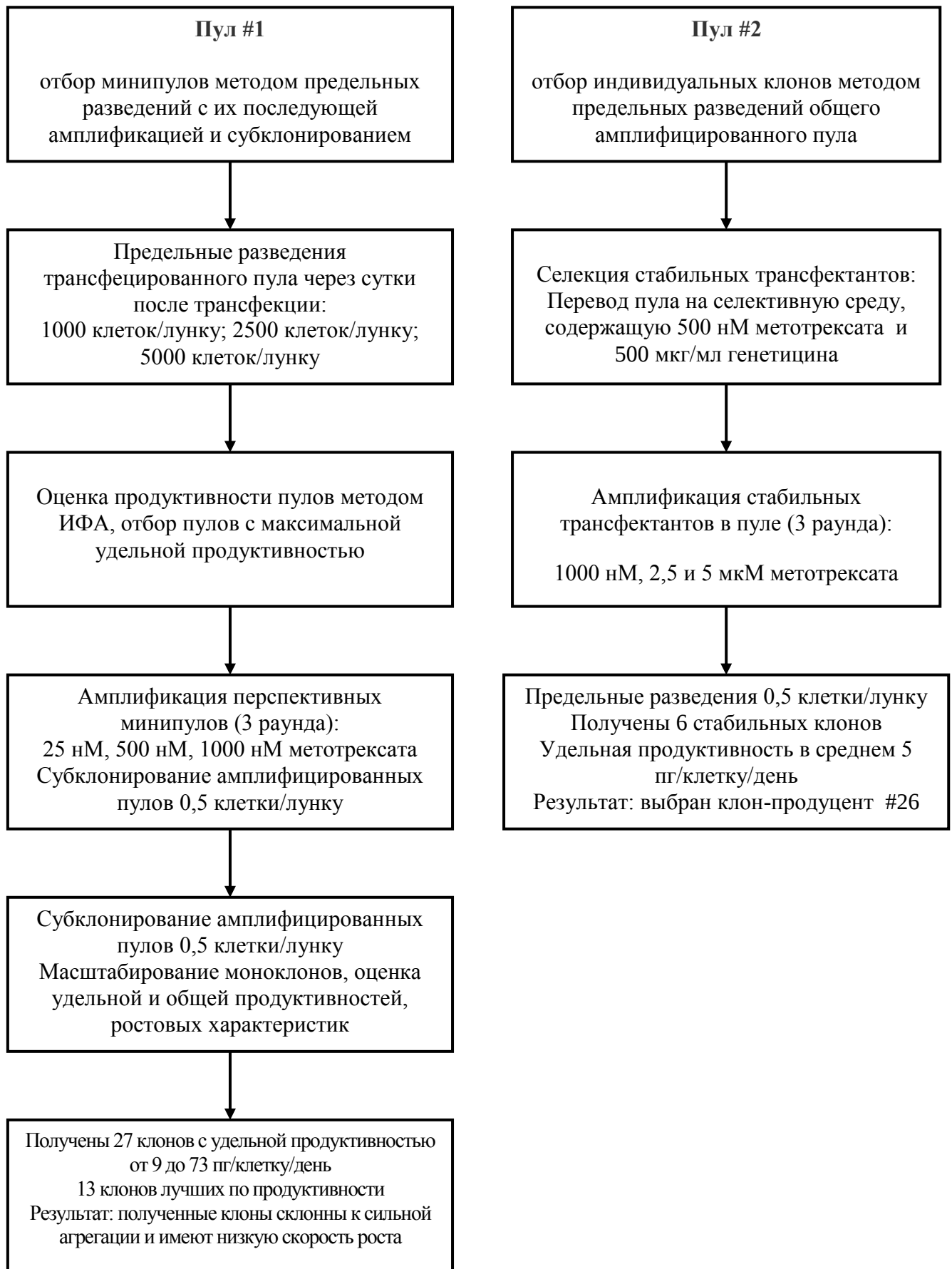


Схема 2 – Последовательность этапов получения клональных клеточных линий по двум стратегиям селекции и амплификации

3.2.2. Оптимизация технологии культивирования клеточной линии СНО-продуцента мАТ Адалимумаб к фактору некроза опухолей альфа

3.2.2.1. Подбор питательной среды и подпитки, оптимальных для культивирования клонов-продуцентов

Оптимизация состава питательной среды является одним из наиболее важных этапов разработки производственной технологии, позволяющих повысить эффективность процесса в несколько раз. Вследствие этого, провели ряд исследований влияния состава коммерческих доступных сред и подпиток (табл. Материалы и методы) на культуральные характеристики и продуктивность суспензионной клеточной линии CHO-DHFR-ADMB26, стабильно продуцирующей моноклональное антитело Адалимумаб. Все среды и подпитки не содержали компонентов животного происхождения и были предназначены для суспензионного культивирования культуры клеток СНО.

На первом этапе культуру клеток постепенно адаптировали к новым средам и проводили циклы культивирования без внесения подпитки в течение четырех суток (Эксперимент №7). На последние сутки культивирования в течение 20 пассажей измеряли плотность клеток, жизнеспособность, рассчитывали время удвоения, скорость роста и удельную продуктивность на клетку. В итоге были получены средние значения по каждому параметру и объединены в таблицу №12.

Результаты Эксперимента №7 позволили провести сравнительную оценку влияния состава сред на эффективность культивирования клеточной линии СНО-DHFR-ADMB26 и выбрать оптимальные варианты сред для следующих исследований (таблица 12, выделены заливкой). В первую очередь, выбор был обусловлен сочетанием таких параметров, как удельная продуктивность и время удвоения. Практически вся линейка сред обеспечивала хорошие результаты. Однако, исключением оказались среды MAM-PF77, EX-Cell Advanced и CDM4CHO, по причине сравнительно низких значений удельной продуктивности и времени удвоения больше 30 часов.

Таблица 12 – Эксперимент №7. Ростовые характеристики и удельная продуктивность клеточной линии CHO-DHFR-ADMB26 на разных средах на четвертый день культивирования

Среда	Концентрация живых клеток, млн клеток/мл	Время удвоения, ч	Удельная продуктивность, пг/кл/сут
BalanCD Growth A	5,38±1,24	26±2	7,2±2,1
Dynamis	7,16±0,87	25±1	9,2±3,9
OptiCHO	7,89±1,55	24±3	10,4±1,5
MAM-PF77	4,27±0,88	32±4	6,5±1,0
Hycell	4,32±1,01	27±3	8,8±2,4
SFM4CHO	6,46±1,12	26±2	15,6±2,2
PowerCHO-2CD	3,53±1,45	34±3	10,2±1,4
CellVento-210	5,87±1,07	27±3	10,7±1,8
CellVento-200	6,46±1,23	26±3	11,7±2,5
CellVento-220	6,46±0,68	26±5	10,5±1,1
ActiCHO	8,22±1,66	24±3	7,9±0,8
EX-Cell Advanced	4,96±1,22	33±4	6,4±1,1
CDM4CHO	4,59±1,39	31±4	6,2±1,4

*Примечание. Заливкой выделены выбранные среды для дальнейших исследований

Второй этап оптимизации заключался в скрининге подпиток в условиях цикла продукции. Для этого использовали подпитки (табл. 1, материалы и методы) в комбинациях с лидирующими средами (табл. 12, выделены цветом). Выбирали не все возможные, а только те комбинации вышеуказанных сред и подпиток, которые с наибольшей вероятностью могли обеспечить высокий результат культивирования, опираясь на литературные данные и на собственный опыт. При этом каждая подпитка была проанализирована не менее чем с двумя средами разных производителей.

Таким образом, был предложен Эксперимент №8 – цикла продукции с подпиткой для выбранных сред и подпиток по схеме, представленной в таблице 13. Следует отметить относительно линейки сред на платформе CHOCellvento (Merck, Германия). Она представляет собой целый ряд химически определенных сред и подпиток (Cellvento 100/110/200/210/220) как в жидкой, так и в порошкообразной форме для суспензионного культивирования CHO, широко используемых в бифармацевтическом производстве.

Таблица 13 – Эксперимент №8. Схема цикла продукции с подпиткой в рамках оптимизации условий культивирования клеточной линии CHO-DHFR-ADMB26

# колбы	Среда	Подпитки
1	Dynamis	4% Efficient Feed C+
2		4% Efficient Feed C+ / 0,3xFMS3
3		1,5% ActiCHO Feed A/B
4		5% BalanCD Feed 2 / 0,3xFMS3
5		4% Cellvento Feed 210
6	OptiCHO	4% Efficient Feed C+
7		1,5% ActiCHO Feed A/B
8	Cellvento 200	4% Cellvento Feed 200
9		4% Cellvento Feed 210
10		4% Cellvento Feed 210 / 0,3xFMS3
11		1,5% ActiCHO Feed A/B
12		5% BalanCD Feed 2 / 0,3xFMS3
13	PowerCHO	4% Efficient Feed C+
14		5% BalanCD Feed 2 / 0,3xFMS3
15	Hycell	4% Efficient Feed C+
16		5% BalanCD Feed 2 / 0,3xFMS3
17	BalanCD Growth A	5% BalanCD Feed 2 / 1-2% FMU
18	ActiCHO	1,5 %ActiCHO Feed A/B
19	SFM4CHO	5-7% Cellboost 2/5
20		1,5 %ActiCHO Feed A/B
21		0,3xFMS3

*Примечание. Упоминание двух подпиток через косую черту означает их попеременное использование.

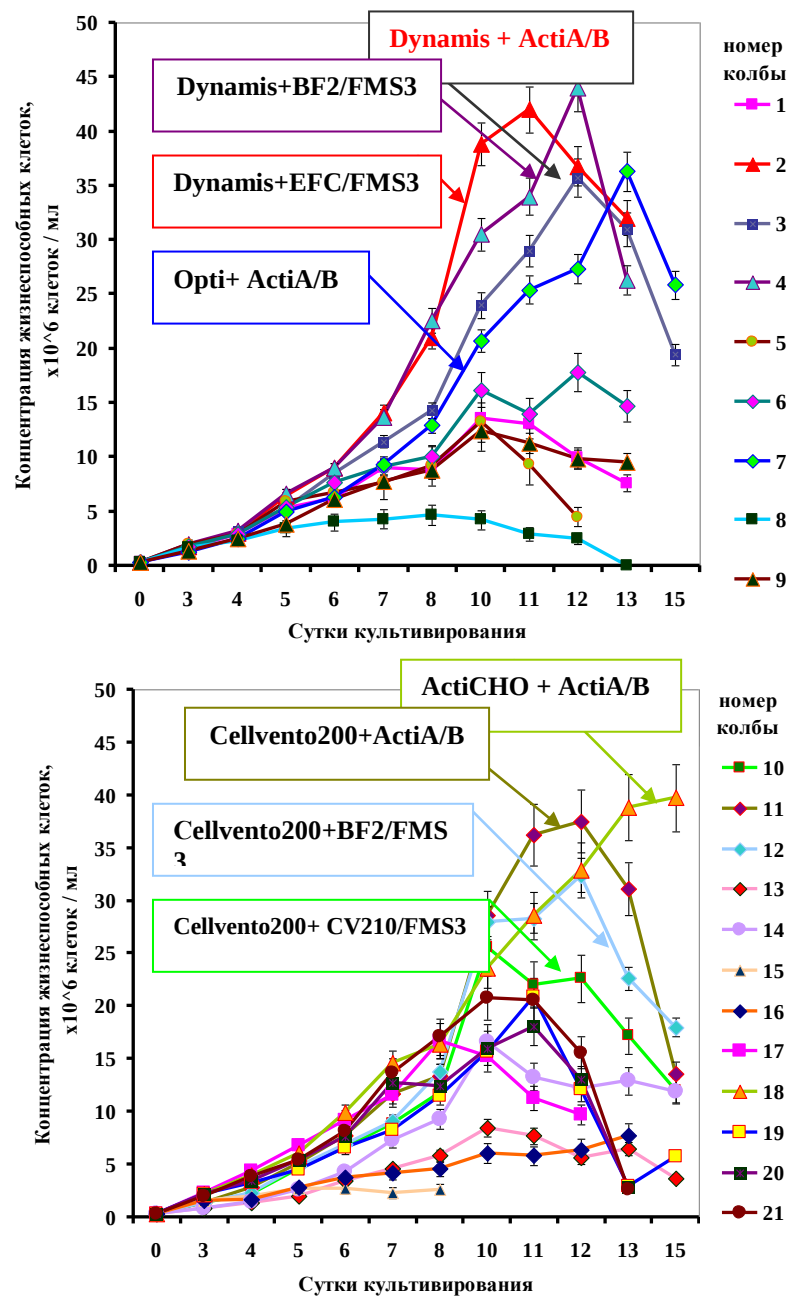


Рисунок 32 – Эксперимент №8. Кривые роста клеточной линии, экспрессирующей моноклональное антитело Адалимумаб в цикле продукции с подпиткой согласно схеме, представленной в таблице №13

Такой ассортимент продукции даёт возможность гибкого выбора наиболее подходящего продукта для достижения лучших результатов для конкретной линии клеток. В связи с этим на первом этапе использовали три последние разработки компании Merck – Cellvento 200/210/220, с целью выбрать конкретный вариант для дальнейших исследований. Однако, результаты в отношении указанных трех серий оказались сравнительно одинаковыми, за исключением Cellvento 200. Поэтому несмотря на улучшенную формулу, заявляемую производителем серии 210 и 220, для

конкретной клеточной линии в рамках Эксперимента №8 выбрали Cellvento 200 (табл. 12). По литературным данным 100-е серии Cellvento достаточно сильно отличаются от их улучшенных вариантов серии 200, в связи с этим не рассматривали их использование в рамках настоящего исследования.

По результатам Эксперимента №8 строили кривые роста (рис. 32) и определяли концентрацию мАТ Адалимумаб в КЖ на последний день культивирования методом гель-фильтрации (рис. 33).

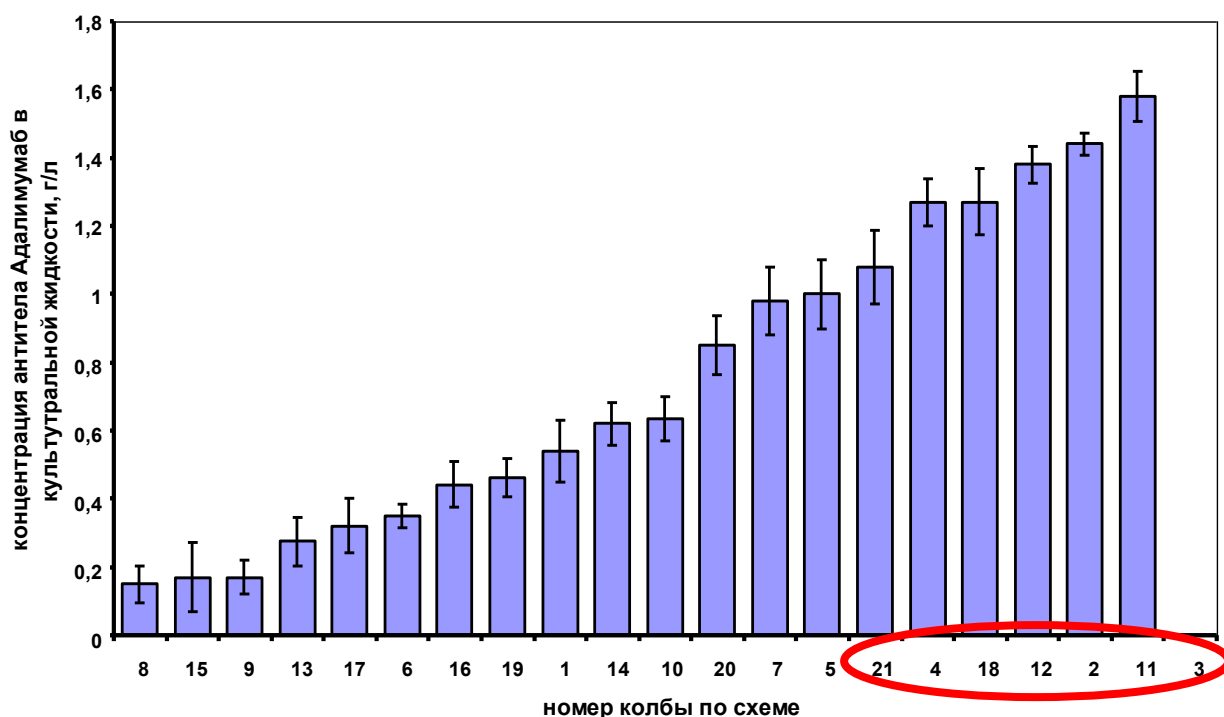


Рисунок 33 – Эксперимент №8. Концентрация моноклонального антитела Адалимумаб в культуральной жидкости на последний день культивирования в цикле продукции с подпиткой согласно схеме, представленной в таблице №13

Таким образом, в результате скрининга целого ряда сред и подпиток в рамках Эксперимента №8 было показано, что нам удалось повысить продуктивность клеточной линии почти в 1,5 раза до 1,6 г/л в случае использования комбинации среды Dynamis и комплексной подпитки ActiCHO Feed A/B.

Однако при выборе конкретных условий культивирования нам следовало учесть не только количество экспрессируемого белка, но и его качество, которое должно было соответствовать оригинальному препарату.

Перед нами стояла задача определить качественные характеристики, моделирование которых является тривиальной задачей на этапах культивирования.

3.2.2.2 Определение качественных характеристик мАТ адалимумаб, моделируемых на этапах культивирования

Так как биологическая активность мАТ адалимумаб благодаря своей структуре идентичной IgG1 заключается как в специфичном связывании ФНО-альфа, так и в реализации его эффекторных функции, главным образом опосредуя механизмы ADCC и CDC, было установлено, что эффективность и безопасность мАТ адалимумаб при разработке культивирования будут главным образом зависеть от посттрансляционных модификаций. Это очевидно, так как связывание с мишенью определяются только первичной структурой, и подтверждается методом пептидного картирования. Было обнаружено по результатам ряда исследований, описанных в литературе, что огромный вклад в реализацию эффекторных функции вносит качественный и количественный состав гликанов, расположенных на Fc фрагменте антитела. Несмотря на то, что масса олигосахаридных цепочек составляет всего 2-3% от массы пептидной части молекулы, гликозилирование в значительной степени влияет на эффективность гликопротеина как будущего препарата.

Ранее в обзоре литературы указано, что профиль гликозилирования, как и другие посттрансляционные модификации белков, будут зависеть в первую очередь от состава среды, а, возможно, и от других параметров культивирования, таких как температура, pH, осмолярность и т.д.

В связи с этим было предложено исследовать состав и структуру гликанов полученного мАТ адалимумаб в эксперименте №8 в сравнении с оригинальным препаратом в рамках его изменчивости.

3.2.2.3 Исследование профиля гликозилирования биосимильного и оригинального МАТ адалимумаб

Для того, чтобы получить профиль гликозилирования¹, продукт выделяли из культуральной жидкости методом ВЭЖХ, обессоливали, обрабатывали N-гликозидазой и анализировали полученные молекулы гликанов методом масс-спектрометрии.

Для выбора критериев приемлемости провели исследование профиля гликанов оригинального препарата (табл.14).

Таблица 14 – Содержание гликозилированных форм (%) в трех исследованных партиях оригинального препарата Хумира (ABBOTT, США)

Гликан	Номенклатура	Содержание форм в различных партиях, %			Среднее значение по всем партиям, %
		1	2	3	
Фукозилированный	G0F	62,3	63,7	66,0	64,0±1,5
	G1F	21,2	19,8	18,6	19,9±1,1
	G2F	2,0	1,7	1,6	1,8±0,2
Нефукозилированный	G0	6,1	6,5	6,7	6,4±0,2
	G1	1,9	1,8	1,7	1,8±0,1
С пятью остатками маннозы	Man5	6,7	6,7	5,5	6,3±0,6

**Примечание:* цифра в номенклатуре комплексных гликанов указывает число остатков галактозы на одну молекулу олигосахарида

Таким образом, было показано, что в трех партиях оригинального препарата обнаружены типичные гликаны моноклональных антител, продуцируемые клетками CHO: комплексные фукозилированные G0F/G1F/G2F и нефукозилированные G0/G1, а также гликаны с 5 остатками маннозы Man5. Следует отметить, что соотношение форм гликанов также

¹ Все представленные результаты в настоящей работе относительно содержания гликозилированных форм получены сотрудником НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика» Сухоженко Алексеем Владимировичем

оказалось вполне стандартно для клеток CHO: они преимущественно содержали фукозу, а не галактозу [244-246, 249].

В результате сравнения профилей гликанов биосимиляра (образцов, полученных в эксперименте согласно схеме, представленной в табл. 13) и оригинального препарата (табл. 14) с учетом уровня продуктивности для дальнейших исследований было показано, что использование комбинации среды Dynamis и комплексной подпитки ActiCHO Feed A/B, обеспечивающей максимальный выход, гарантирует довольно близкое содержание гликозилированных форм (рис. 34).

Таблица 15 – Комбинации сред и подпиток, обеспечивающих высокую продуктивность клеточной линии CHO-DHFR-ADMB26, и профиль гликозилирования антитела при их использовании

№ колбы по схеме (табл.3)	Среда	Подпитка	Продуктивность, г/л	Содержание гликозилированных форм, %					
				G0F	G1F	G2F	G0	G1	Man5
18	ActiCHO P	ActiCHO Feed A/B	1,24±0,09	34,5±0,6	45,0±0,4	10,3±0,2	4,1±0,3	4,30±0,01	2,1±0,03
21	SFM4CHO	FMS3	0,90±0,05	37,2±0,4	40,6±0,8	11,1±0,5	4,5±0,5	3,91±0,02	2,9±0,06
2	Dynamis	Efficient Feed B+ /FMS3	1,38±0,06	67,5±0,9	19,4±0,2	2,1±0,3	8,1±0,3	2,03±0,02	0,90±0,07
3	Dynamis	ActiCHO Feed A/B	1,58±0,10	70,8±0,5	16,6±0,5	1,3±0,7	8,1±0,4	1,70±0,08	1,70±0,02
4	Dynamis	BalanCD Feed2/FMS3	1,09±0,03	63,9±0,3	22,7±0,9	2,7±0,5	7,6±0,6	2,32±0,02	0,82±0,05
11	CellVento-200	ActiCHO Feed A/B	1,44±0,08	71,4±0,2	14,5±0,7	1,2±0,6	8,3±0,4	1,54±0,03	3,31±0,04
12	CellVento-200	BalanCD Feed2/FMS3	1,27±0,05	60,7±0,6	25,2±0,3	3,0±0,2	7,3±0,5	2,64±0,05	1,23±0,03

*Примечание. Цветом выделена лучшая комбинация по профилю гликозилирования и продуктивности.

Как видно из таблиц 14 и 15, содержание остатков галактозы и фукозы антитела, полученного с использованием среды Dynamis с подпитки ActiCHO Feed A/B, наиболее близко к оригинальному препарату (рис. 34). Однако следует отметить, что в этом случае было обнаружено существенное отличие по содержанию минорного гликана Man5 – 1,7% против 6,3% в оригинальном препарате.

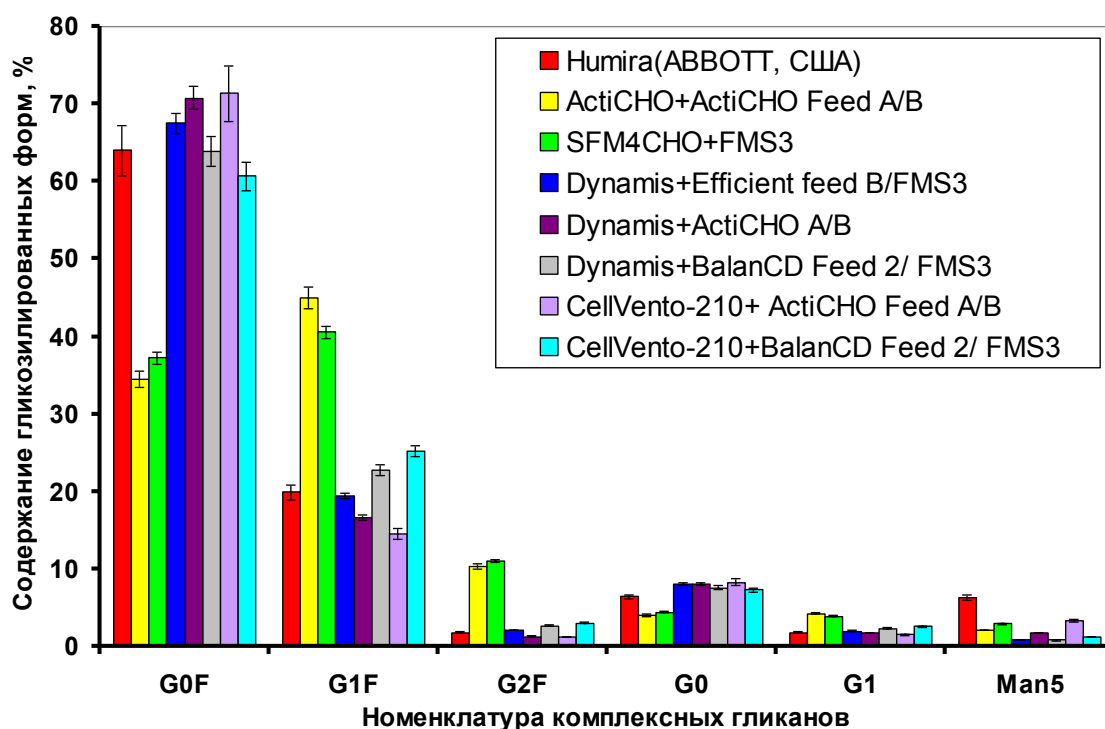


Рисунок 34 – Сравнение содержания гикозилированных форм в исследуемых образцах моноклонального антитела Адалимумаб и оригинальном препарате

Кроме того, следует отметить, на данном этапе пришлось столкнуться с тем, что производитель комплексной подпитки ActiCHO Feed A/B остановил выпуск и предложил вместо нее использовать аналогичный продукт с похожим составом Cell Boost 7a/b. Использование последней не повлияло на продуктивность, это условие так же позволило достигнуть продуктивности ($1,5 \pm 0,1$) г антитела на литр культуральной жидкости, но внесло некоторые изменения в профиль гликозилирования биоподобного антитела. Результаты сравнительного анализа профиля гликозилирования антитела, полученного в случае культивирования с подпиткой Cell Boost 7a/b, и оригинального прерарата представлены в таблице 16.

В проанализированных образцах было детектировано существенное отличие между оригинальным и биоподобным антителом по суммарному содержанию как фукозилированных, так и нефукозилированных форм. Наряду с этим, наибольшая разница отмечена в относительном количестве

минорного гликана Man5 (1,6% против 6,3%, соответственно), как и в случае использования комплексной подпитки ActiCHO Feed A/B.

Таблица 16 – Содержание гликозилированных форм в исследованных партиях оригинального препарата Хумира (Humira ABBOTT, США) и биосимиляра

Глик ан	Содержание форм в различных партиях оригинального препарата, %				Содержание форм в различных сериях биоаналога, %			
	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Среднее ± 3 CO	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Среднее ± 3 CO
G0F*	62,3	63,7	66,0	64,0 $\pm$ 5,7	75,4	78,9	76,3	76,8 $\pm$ 4,8
G1F	21,2	19,8	18,6	19,8 $\pm$ 3,9	13,2	11,6	12,7	12,5 $\pm$ 2,1
G2F	2,0	1,7	1,6	1,7 $\pm$ 0,6	1,0	0,8	1,1	1,0 $\pm$ 0,3
G0	6,1	6,5	6,7	6,4 $\pm$ 0,9	7,7	6,5	7,3	7,1 $\pm$ 1,5
G1	1,9	1,8	1,7	1,8 $\pm$ 0,3	1,2	0,9	1,2	1,1 $\pm$ 0,3
Man5	6,7	6,7	5,5	6,3 $\pm$ 2,1	1,7	1,4	1,6	1,6 $\pm$ 0,3
Содержание нефукозилированных форм, %				14,5 $\pm$ 3,3	Содержание нефукозилированных форм, %			9,8 $\pm$ 2,1

В связи с этим на данном этапе разработки технологии нам необходимо было решить две задачи: во-первых, оценить значимость этих различий для полученного антитела в качестве будущего лекарственного средства, а во-вторых, исследовать масштабируемость разработанной технологии и исследовать влияние различных условий культивирования на ростовые характеристики клеточной линии, продуктивности и качество экрессируемого продукта в рамках масштабирования.

3.2.2.4 Оценка значимости различий в профиле гликозилирования биосимилярного и оригинального МАТ адалимуаб

По литературным данным известно, что именно нефукозилированные гликаны вносят существенный вклад в связывание антитела с рецептором Fc-фрагментов третьего типа (FcγRIIIA) на поверхности натуральных киллеров, обуславливающего опосредованную антителами клеточную цитотоксичность. Показано, что это взаимодействие сильно зависит от содержания фукозы в N-связанных олигосахаридных группах антитела [247]. Так, при отсутствии фукозы связывание в 50 раз сильнее, чем при ее

наличии, что существенным образом влияет и на цитотоксичность антитела в клеточных тестах и *in vivo* [248].

В одной из работ было проведено детальное сравнение связывания с рецептором FcγRIII антител с маннозными, комплексными и гибридными гликанами, причем последние две формы содержали или не содержали фукозу [248]. Показано, что независимо от структуры любые нефукозилированные антитела связываются с рецептором с более высокой эффективностью, чем фукозилированные. Таким образом, маннозные формы гликанов представляют большой интерес в случае необходимости оптимизации ADCC для препаратов терапевтических моноклональных антител [249, 250].

Однако, в другой работе, касательно количественного содержания формы Man5 в профиле гликозилирования белков, отмечают, что его присутствие является нежелательным для препаратов антител из-за обусловленного им повышенного клиренса, в связи с чем, его более низкая концентрация в полученном продукте по сравнению с оригинальным препаратом может рассматриваться как преимущество.

Учитывая все вышесказанное, было предложено провести сравнительный анализ на связывание мАТ адалимумаб с рецептором FcγRIIIA методом твердофазного ИФА. Таким образом, мы подтвердили факт влияния различий в профиле гликозилирования полученного и оригинального антител на эффективность связывания с рецептором. Результаты оценки связывания представлены на рисунке 35.

Рассчитанное с помощью программы OriginPro значение полумаксимальной эффективной концентрации (EC50) для мАТ адалимумаб оказалась почти на порядок выше, чем в оригинаторе – 1650 нМ против 190 нМ. Поскольку данный параметр определяет эффекторную функцию антитела ADCC, стала очевидной необходимость оптимизации состава гликанов биоподобного мАТ адалимумаб с целью достижения близкого к оригинальному.

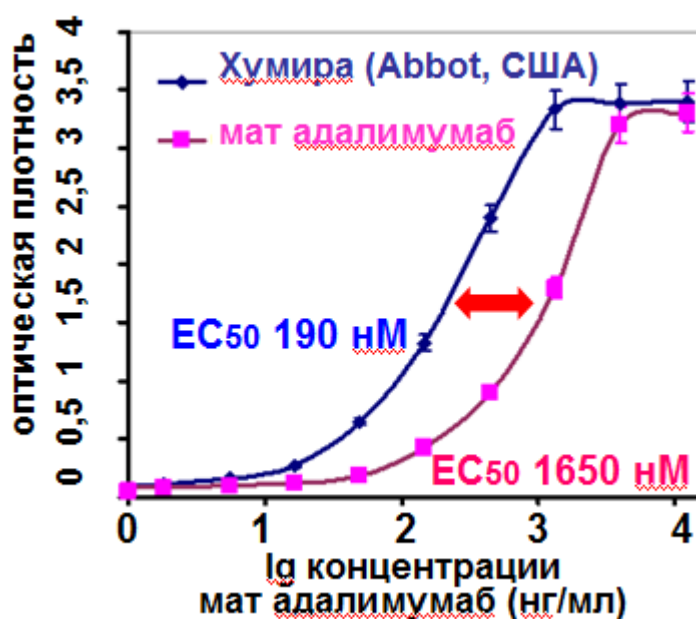


Рисунок 35 – Сравнительная оценка связывания антител с рецептором FcγRIIIA методом твердофазного ИФА

3.2.2.5 Оптимизация профиля гликозирования моноклонального антитела адалимумаб

Так как основная задача состояла в повышении доли Man 5 (существенные различия именно по этому гликану), анализируя литературные данные, было предложено использовать следующие вещества, которые могли бы оказать влияние на содержание маннозных гликанов в профиле гликозирования антитела адалимумаб: хлорид марганца, глюкозамин, хлорид натрия, монензин и сахарозу. Эксперименты проводили в среде Dynamis с подпиткой CellBoost 7a/b в колбах малого объема при перемешивании в режиме длительного культивирования в рамках цикла продукции с подпиткой в трех повторностях [251, 252].

а) хлорид марганца

В результате внесения хлорида марганца на нулевые сутки культивирования, на основании проведенных экспериментов можно сделать следующие выводы. Как видно из таблицы 17 и рисунка 36 добавление исследуемых концентраций хлорида марганца от 1 до 40 мкМ слабо

повлияло на содержание гликоформы Man5, более того, это привело к снижению его процентной доли, что оказалось противоположным эффектом ожидаемому. При этом внесение хлорида марганца даже в концентрации 1 мкМ отражается на профиле комплексных гликанов G0F/G1F/G2F. Кроме того, было показано, что добавление более высоких концентраций хлорида марганца (100 и 200 мкМ) являлось токсичным для клеток-продуцентов, что повлекло резкое снижение выхода целевого продукта.

Таблица 17 – Содержание гликозилированных форм в образцах полученного антитела при внесении хлорида марганца при культивировании в сравнении с оригинальным препаратом

Номенклатура	Humira (ABBOTT, США)	0 мкМ MnCl ₂	1 мкМ MnCl ₂	4 мкМ MnCl ₂	15 мкМ MnCl ₂	40 мкМ MnCl ₂
	Содержание гликозилированных форм, %					
Man5	5,05±0,05	3,30±0,05	0,80±0,01	0,80±0,01	0,80±0,01	1,25±0,05
G0F	62,75±0,05	67,75±0,25	30,25±0,15	27,85±0,25	26,07±0,10	23,85±0,05
G0	7,00±0,01	7,95±0,15	3,40±0,02	3,15±0,05	3,15±0,05	3,04±0,01
G1a+G1b	1,95±0,05	1,55±0,05	4,30±0,02	4,03±0,10	4,35±0,05	5,02±0,01
G1Fa + G1Fb	21,40±0,10	15,85±0,01	49,15±0,05	50,05±0,05	50,55±0,05	49,30±0,10
G2F	1,85±0,05	1,85±0,02	12,20±0,1	13,90±0,01	14,45±0,05	15,75±0,15

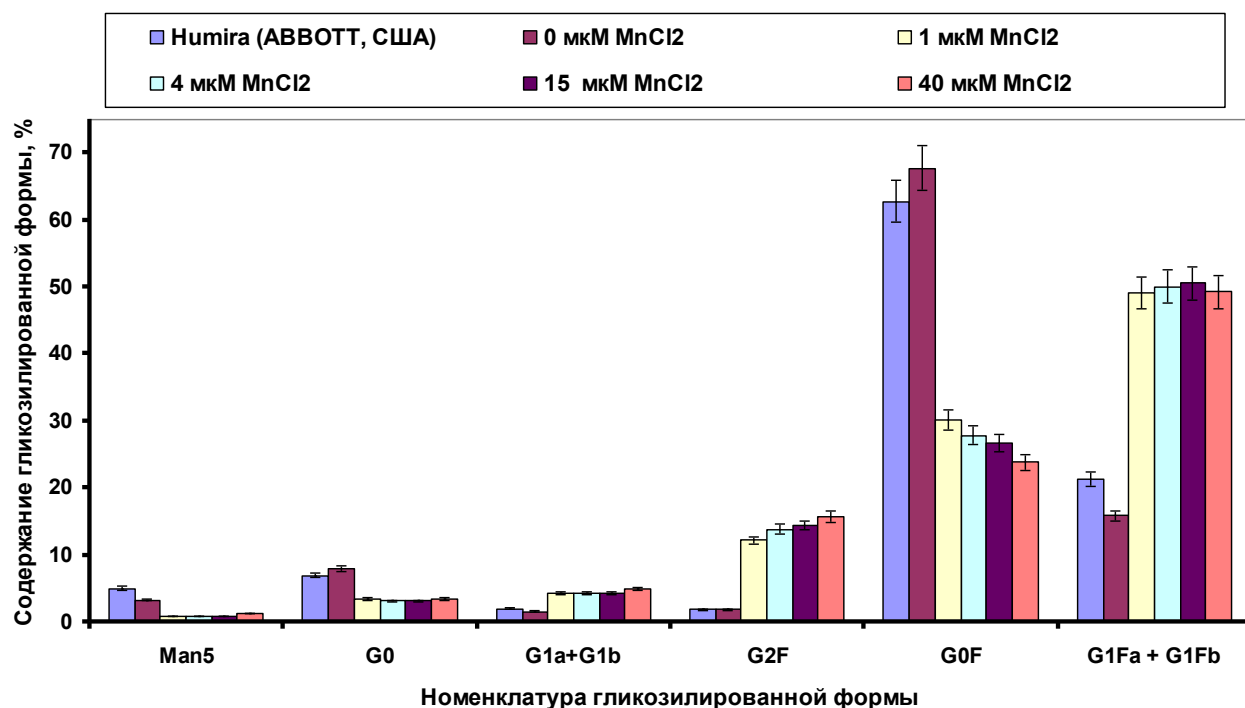


Рисунок 36 – Влияние хлорида марганца, вносимого в питательную среду в концентрации от 1 до 40 мкМ на профиль гликозилирования моноклонального антитела адалимумаб

б) глюкозамин и хлорид натрия

В случае добавления глюкозамина в концентрации 5 и 10 мМ на нулевые сутки и 50 мМ хлорида натрия с 3-его дня культивирования было показано, что глюкозамин токсичен для клеток-продуцента в концентрации 10 мМ, но может быть использован в концентрации 5 мМ. Однако, в такой молярности его влияние на содержание гликана Man5 противоположно желаемому (табл. 18, рис. 37). При повышении осмолярности путем добавления 50 мМ NaCl наблюдали отрицательное влияние на культуральные характеристики и продуктивность клеточной линии. Стоит отметить небольшое изменение содержания всех гликанов, которое, к сожалению, не позволило приблизиться к желаемому профилю.

Таблица 18 – Содержание гликозилированных форм в образцах полученного антитела при внесении глюкозамина и хлорида натрия при культивировании в сравнении с оригинальным препаратом

Номенклатура	Humira (ABBOTT, США)	Контроль	5 мМ глюкозамина	50 мМ хлорида натрия
	Содержание гликозилированных форм, %			
Man5	5,05±0,05	2,80±0,05	2,20±0,01	3,60±0,01
G0F	62,75±0,05	72,00±0,10	82,00±0,01	60,50±0,10
G0	7,00±0,01	8,10±0,15	9,20±0,15	7,00±0,05
G1a+G1b	1,95±0,05	1,30±0,17	0,50±0,05	2,30±0,05
G1Fa + G1Fb	21,40±0,10	14,30±0,01	5,70±0,05	23,30±0,15
G2F	1,85±0,05	1,40±0,01	0,40±0,01	3,30±0,05

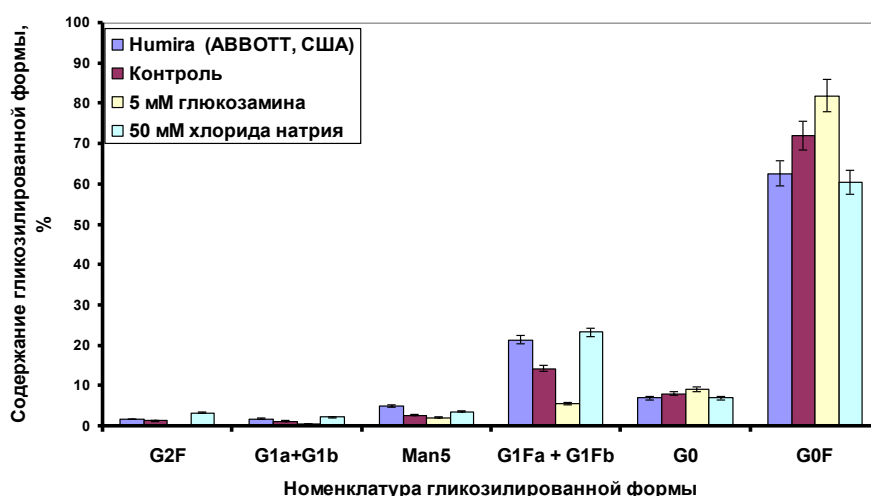


Рисунок 37 – Влияние глюкозамина и хлорида натрия на профиль гликозилирования моноклонального антитела адалимумаб

в) ионофорный антибиотик монензин

Нами был выбран диапазон концентраций монензина, являющихся относительно безопасными для клеточной культуры СНО (не вызывающих серьёзные токсические эффекты). При засеве колб (на нулевые сутки) вносили монензин до конечной концентрации 5, 10, 20, 30, 40 и 60 нМ. На рис. 38А и Б представлены кривые роста и жизнеспособности клеток в течение эксперимента.

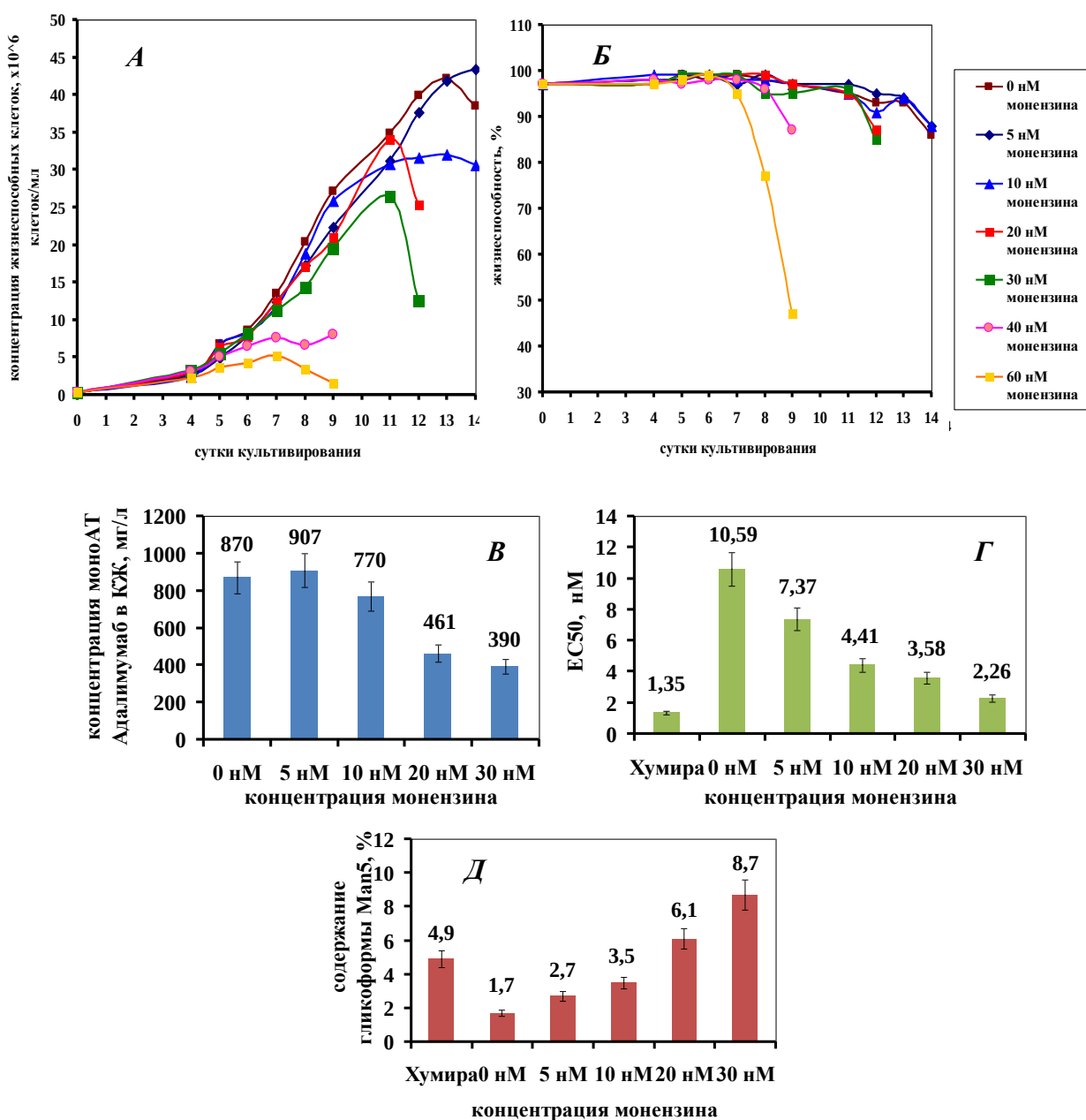


Рисунок 38 – Данные по клеточному росту и жизнеспособности (А, Б), продуктивности (В), составу гликанов Адалимумаба (Г) и связыванию с рецептором FcγRIII (Д) в ходе эксперимента с монензином

Концентрации монензина 40 и 60 нМ плохо переносились клетками, что сказалось на их росте и жизнеспособности, которая снизилась на 9 сутки (рис. 38 А, Б). Колбы с данными концентрациями монензина были утилизированы и не использовались для дальнейшего анализа. Из всех остальных колб проводили выделение антитела из КЖ на последние сутки культивирования с целью оценки продуктивности, анализа гликанов и связывания с рецептором FcγRIII. Результаты этих исследований приведены на рисунках 38 В-Д.

Как видно из представленных данных, повышение концентрации монензина, вносимого в культуральную среду, сказывается негативным образом на клеточном росте и, соответственно, продуктивности. При этом наблюдается положительная динамика в плане повышения содержания гликоформы Man5 – так, для образца с 30 нМ монензина содержание Man5 составило 8,8%, а EC50 при связывании с рецептором FcγRIII уменьшилось в 5 раз, по сравнению с контролем, что свидетельствует о более сильном взаимодействии данных молекул. Поскольку внесение в культуральную среду 30 нМ монензина значительно снижает выход мАТ в сравнении с контролем, применение данной концентрации не является целесообразным.

Добавление в культуру 5 и 10 нМ монензина хорошо переносилось клетками, однако, было недостаточным для повышения содержания гликана Man5 до уровня оригинатора (рис. 38Г). Внесение 20 нМ монензина являлось наиболее эффективным для достижения желаемого эффекта по повышению содержания гликоформы Man5, но несколько хуже переносилось клетками, по сравнению с меньшими концентрациями антибиотика (рис. 38 А, В). Для того что минимизировать токсические эффекты на клеточную культуру, нами был проведён эксперимент по подбору оптимальной схемы внесения 20 нМ монензина в культуральную среду.

Схема добавления монензина в колбы с культурой приведена на рисунке 39. Контролями служили колбы без добавок, а также колба с 20 нМ

монензина, вносимого однократно на 0 сутки культивирования. Условия проведения эксперимента соответствовали таковым для предыдущего эксперимента.

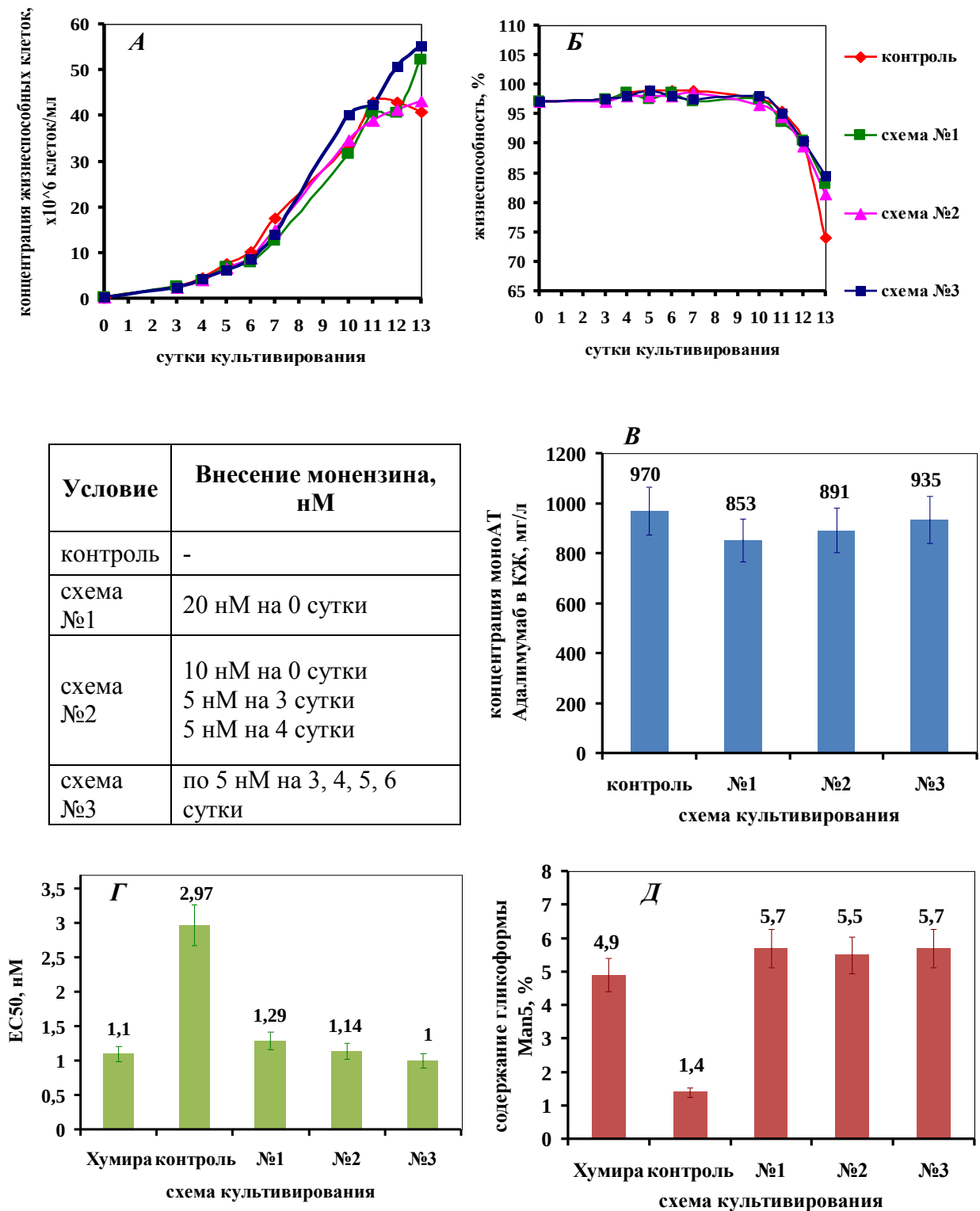


Рисунок 39 – Данные по клеточному росту и жизнеспособности (А, Б), продуктивности (В), составу гликанов Адалимуаба (Г) и связыванию с рецептором FcγRIII (Д) в ходе эксперимента по подбору оптимальной схемы внесения монензина

Две схемы внесения монензина подбирались таким образом, чтобы равномерно распределить нагрузку на клеточный аппарат и при этом достичь желаемого эффекта по содержанию гликана Man5.

Как видно из рисунка 39, внесение 20 нМ монензина приводит к незначительному снижению скорости роста клеток по сравнению с контролем – при использовании схемы №1 наблюдается снижение клеточной плотности на 7-10 сутки культивирования, схемы №2 на 10-12 сутки (рис. 39, А). Наименьшее негативное влияние на культуральные характеристики было достигнуто с использованием схемы №3 (рис. 39, А, Б).

По продуктивности были получены несколько сниженные, по сравнению с контролем, значения для схем №1 и 2 (рис. 39, В). Введение монензина по схеме №3 не привело к значительному снижению концентрации целевого продукта в КЖ. Таким образом, оптимальным для клеток явилось постепенное внесение монензина в культуральную среду – по 5 нМ в течение 4 суток, начиная с 3 дня. Наблюдаемый эффект можно интерпретировать следующим образом – клеточная культура является наиболее чувствительной к внесению посторонних агентов на этапе экспоненциальной фазы роста, поэтому следует дать возможность клеткам вырасти в течение первых 3-4 суток до приемлемых клеточных плотностей, после чего начинать вводить токсический агент в малых дозах. Данный подход способствует более мягким условиям для перестройки клеточного метаболизма в ответ на введение нового агента.

Что касается наиболее интересного для наших целей параметра – содержания гликоформы Man5 – по результатам можно заключить, что использование всех схем оказалось в равной степени эффективным, таким образом, была подтверждена целесообразность применения монензина в концентрации 20 нМ (рис. 39, Г). По данным ИФА на связывание антитела с рецептором FcγRIII, наиболее близким к Хумире по данному параметру является образец, полученный по схеме №3 (рис. 39, Д). Таким образом, по

совокупности факторов (клеточный рост, продуктивность, связывание с рецептором FcγRIII) оптимальным является применение схемы №3.

Несмотря на доказанную в проведенных нами экспериментах эффективность монензина как модулятора гликозилирования, существует ряд ограничений для его применения в культивировании с целью получения биофармацевтических препаратов. Во-первых, монензин требует в качестве растворителя метанола или этанола, при этом обладает низкой стабильностью при хранении в растворе. Во-вторых, обладает токсичностью, и, хотя применяемые нами концентрации на 3-4 порядка ниже токсичных концентраций для млекопитающих, есть небольшая вероятность попадания монензина в конечный препарат. Очевидно, что применение данного соединения в биофармацевтике сопряжено с регуляторными рисками. В связи с этим нами решено было опробовать также другие способы модификации гликозилирования антитела.

г) сахароза

Внесение сахарозы в колбы осуществляли при засеве колб, затем продолжали внесение с 3 суток культивирования в соответствии со схемой, приведенной на рис. 40. Контролем служили колбы, в которые не вносили сахарозу. Данные по клеточной плотности и жизнеспособности, а также концентрации антитела в КЖ и связыванию с рецептором FcγRIII представлены на рис. 40.

Сопоставимый с контролем рост клеток наблюдался при внесении в среду сахарозы до концентрации 20 мМ. Начиная с 30 мМ, сахароза оказывала ингибирующее действие на рост клеток (рис. 40А). Жизнеспособность культур во всех случаях оставалась аналогичной и превышала 80%, за исключением колб с максимальными концентрациями сахарозы – 100 и 150 мМ (рис. 40Б).

Значения продуктивности, полученные после очистки антитела из КЖ на сорбенте MabSelect, были ожидаемыми – наиболее низкий выход детектировался в пробе с концентрацией сахарозы 150 мМ, в пробах с 10-40

мМ сахарозы выход антитела снизился на 5-12%, по сравнению с контролем, а с добавлением 60-100 мМ сахарозы – на 15-25% (рис. 40В).

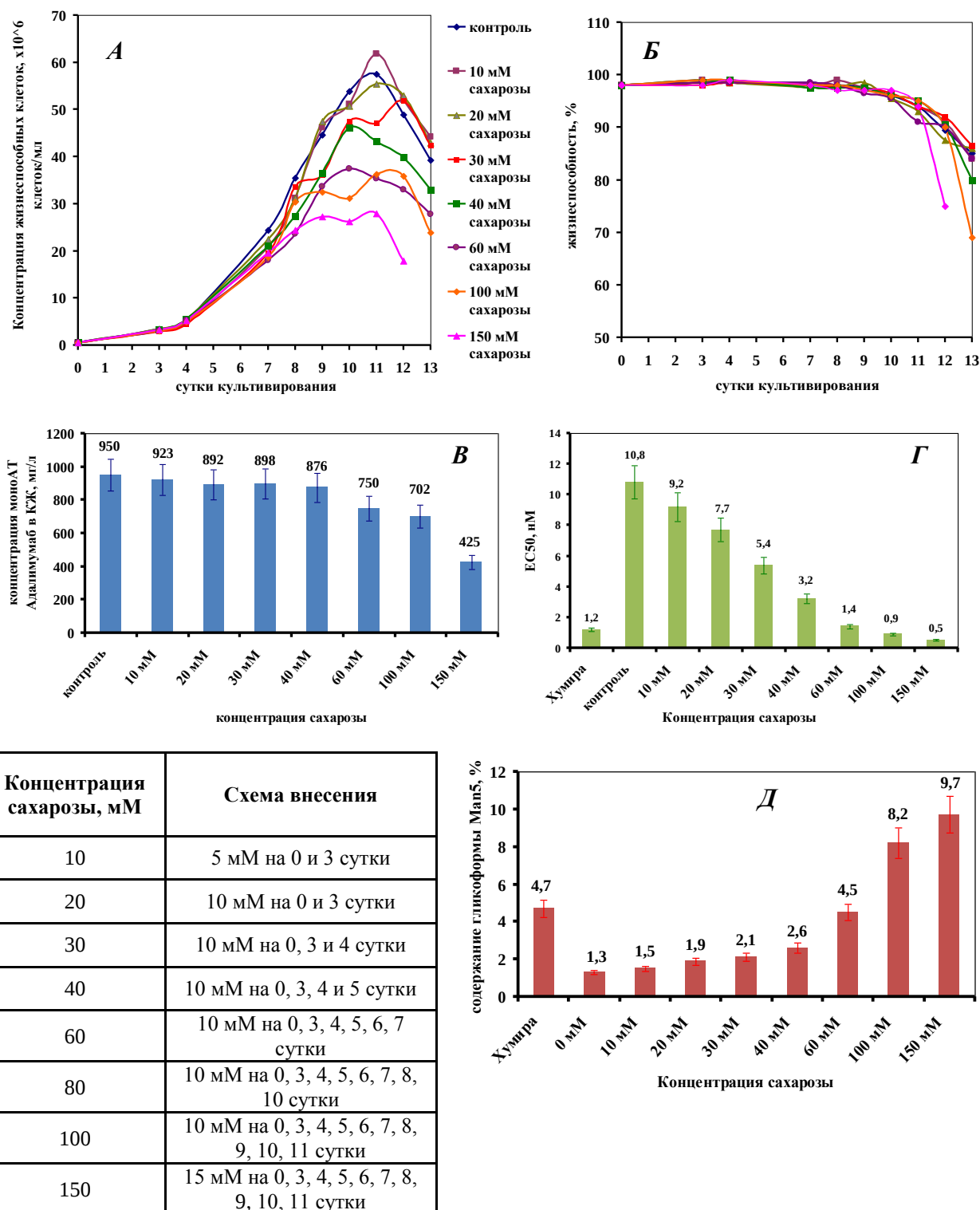


Рисунок 40 – Данные по клеточному росту и жизнеспособности (А, Б), продуктивности (В), составу гликанов адалимумаба (Г) и связыванию с рецептором FcγRIII (Д) в ходе эксперимента по внесению сахарозы

По полученным данным можно сделать вывод, что сахароза в концентрациях 10-60 мМ хорошо переносится клетками, и ее добавление не приводит к значительному снижению продуктивности.

Следующим этапом была оценка содержания гликоформы Man5 в элюатах, полученных после очистки КЖ на сорбенте MabSelect. На рис. 40Г показано влияние сахарозы на содержание гликоформы Man5 в исследуемых образцах. Сахароза в концентрации 10-20 мМ слабо влияет на содержание данного гликана, однако начиная с 30 мМ, детектируется заметное возрастание процентного содержания формы Man5.

Оптимальный результат был детектирован в пробе с 60 мМ сахарозы – 4,5 % Man5, что близко к содержанию этого типа гликана в оригинальном препарате Хумира (рис. 40Д). Очевидно, что внесение сахарозы в культуральную среду способствовало смещению профиля гликанов в сторону высокоманнозных форм. Из данных литературы известно, что сахароза, а также некоторые другие сахара (фруктоза, тагатоza, манноза, лактулоза и др.) является медленно метаболизируемыми субстратами для клеток CHO [232, 233]. Предположительно, накопление этих субстратов в клетках замедляет реакции гликозилирования, приводящие к образованию форм с остатками N-ацетилглюкозамина на обеих ветвях гликанов (которые в дальнейшем подвергаются фукозилированию и галактозилированию). Таким образом, в данных условиях в клетках усиливается протекание реакций по метаболическому пути, приводящему к образованию высокоманнозных форм.

По связыванию антитела с рецептором FcγRIII наилучший показатель получен также для 60 мМ сахарозы – наиболее близкое к Хумире значение EC50 (1,4 против 1,2 нМ, соответственно) (рис. 40 Г). Для концентраций сахарозы 10-40 мМ связывание с рецептором оказалось слабее, чем для Хумиры, а для концентраций 100 и 150 мМ значения EC50 составили 0,9 и 1,5 нМ, что свидетельствует о более сильном взаимодействии, чем у оригинатора. Таким образом, внесение в культуральную 60 мМ сахарозы

является оптимальным с точки зрения культуральных характеристик и эффективным для оптимизации эффекторных функций антитела, в частности ADCC.

Таким образом, проведена коррекция маннозных гликанов в рекомбинантном моноклональном антителе к фактору некроза опухолей альфа при культивировании клеток линии CHO. Показана эффективность внесения в среду 20 нМ ионофорного антибиотика монензина для повышения доли высокоманнозной гликоформы Man5, что сочеталось с ухудшением роста и продуктивностью клеточной линии. Подтверждено, что содержание гликоформы Man5 в профиле гликозилирования моноклонального антитела может быть приведено в соответствии с содержанием гликозилированных форм в оригинальном препарате путем внесения сахарозы в концентрации 60 мМ, как наиболее предпочтительного агента, который позволяет сохранить культуральные характеристики и продуктивность клеточной линии.

Однако, как было отмечено выше, в ходе разработки технологии культивирования производитель GE Healthcare осуществил замену подпитки ActiCHO Feed A/B на CellBoost 7a/b, что существенно повлияло и на галактозилирование антитела. Вследствие чего отличие мАТ адалимумаб от оригинального по этому показателю стало более выраженным. На данном этапе было предложено предпринять дополнительные меры для решения этой проблемы.

д) коррекция профиля гликозилирования методом сочетания сред для культивирования

Согласно проведенным ранее скринингам сред и подпиток было отмечено, что сочетание среды ActiCHO с подпитками ActiCHO Feed A/B обеспечивает более высокий уровень галактозилирования (существенно выше оригинатора) при сравнимых культуральных показателях и продуктивности (табл.14 стр.131, рис. 41).

В связи с этим, было предложено корректировать галактозилирование путем использования сочетания сред Dynamis и ActiCHO в разных соотношениях, что позволило бы достичь сравнимого с оригинатором галактозилирования при стандартной схеме добавления подпиток CellBoost 7a/b.

Таким образом, исследовали разные соотношения Dynamis и ActiCHO и выявили, что сочетание указанных сред в пропорции 12:1, соответственно, в режиме культивирования с периодическим добавлением подпитки CellBoost 7a/b и 60 Мм сахарозы обеспечивает профиль гликозирования мАТ Адалимумаб аналогичный оригинальному в рамках его изменчивости (рис. 42) с сохранением продуктивности. Кроме того, положительные результаты оптимизации были подтверждены в анализе на связывания моноклонального антитела адалимумаб с рецептором FcγRIIIA методом твердофазного ИФА (результаты не приведены).

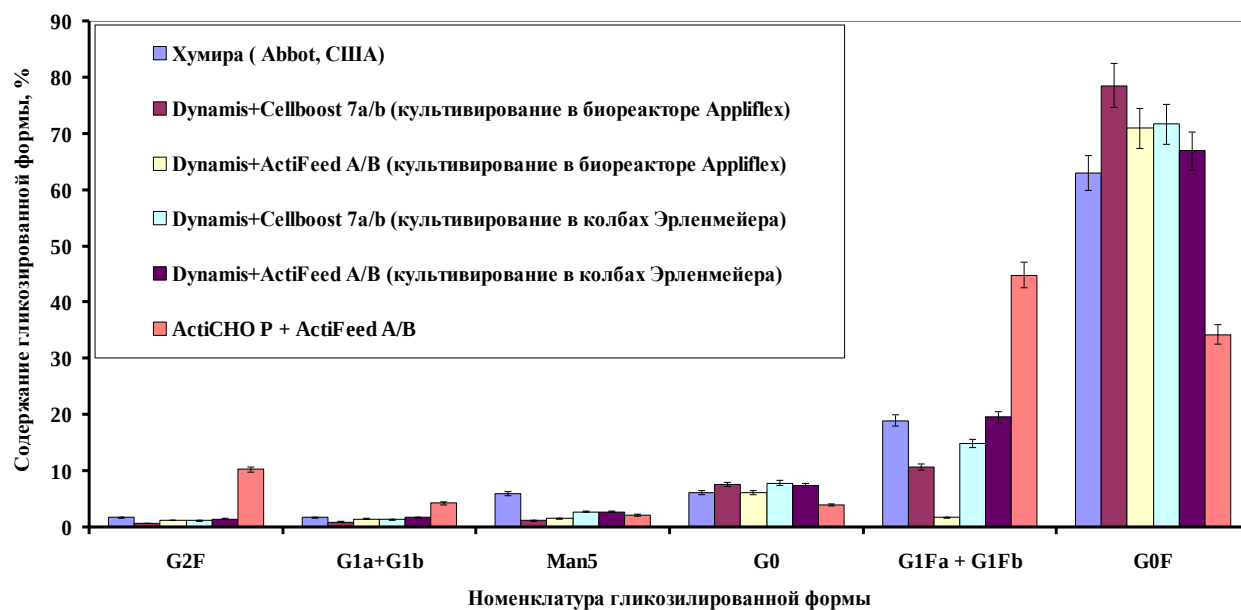


Рисунок 41 – Содержание гликозированных форм в образцах полученного антитела при культивировании в разных условиях в сравнении с оригинальным препаратом

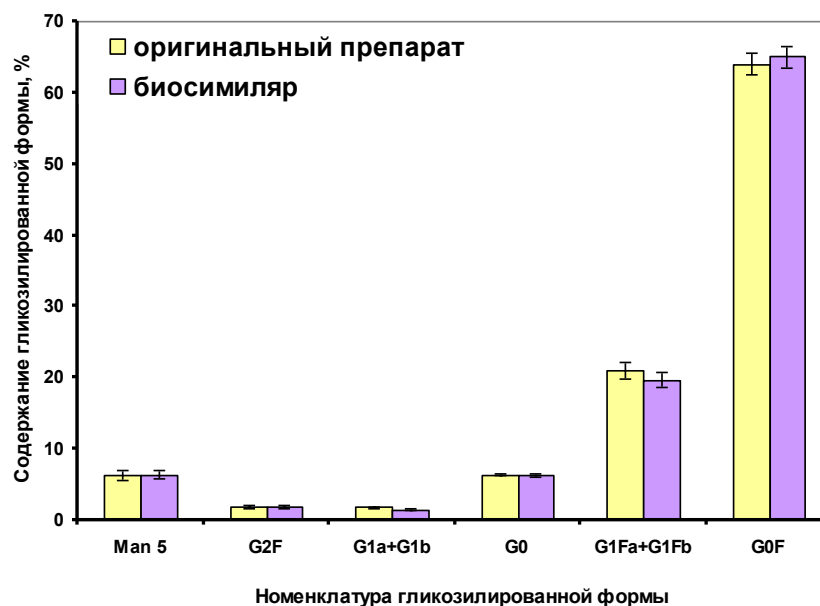


Рисунок 42 – Содержание гликозилированных форм в образцах полученного антитела при культивировании в условиях сочетания сред Dynamis и ActiCHO в пропорции 12:1, соответственно, с периодическим добавлением подпитки CellBoost 7a/b и дополнительным внесением 60 Мм сахарозы по ранее разработанной схеме

Следующая задача заключалась в масштабировании разработанной технологии в биореакторах разного типа в объеме до 50 л, сравнении эффективности культивирования и оценке качества получаемого продукта в рамках изменчивости препарата оригинатора.

3.2.3 Масштабирование технологии культивирования клеточной линии CHO-DHFR-ADMB26 для производства моноклонального антитела адалимумаб

В рамках следующего этапа наших исследований по разработке технологии культивирования необходимо было изучить масштабируемость разработанного подхода в разных типах биореакторов [253].

3.2.3.1 Подготовка инокулята

Процесс подготовки посевного материала многоступенчатый, состоит из нескольких последовательных этапов. Поддержание и подготовка культуры клеток является очень важным моментом, так как продуцент, его физико-биохимические характеристики и свойства определяют эффективность всего биотехнологического процесса.

При выращивании посевных доз инокулята применяют принцип масштабирования, то есть проводят последовательное наращивание биомассы продуцента в колбах малого объема, затем в колбах от 1 до 5 литров или в одноразовых мешках для культивирования, в зависимости от того, какой объем биомассы необходим для засева биореактора. При этом очень важно, чтобы культура клеток поддерживалась в экспоненциальной фазе роста.

Для подготовки инокулята исследовали ростовые характеристики клеточной линии в разных условиях (рис. 43): в колбах Corning на 250 мл с рабочим объемом 50 мл, на 1000 мл с рабочим объемом 200 мл, на 5000 мл с рабочим объемом 2000 мл, в колбах Thomson на 250 мл с рабочим объемом 125 мл, на 5000 мл с рабочим объемом 2500 мл и одноразовом мешке Cellbag (GE, США) на 5л.

Безусловно, эффективность перемешивания, которая влияет на равномерность распределения питательных веществ и насыщения среды кислородом, в мешке выше, чем в колбах, так как объем воздуха над средой в колбе составляет не менее 2/3 от общего объема сосуда, тогда как в мешке около 1/2 общего объема. За счет волнового перемешивания увеличивается площадь поверхности газообмена, при этом практически не создаются гидродинамические нагрузки, повреждающие клетки.

Колбы Corning и Thomson на 5 л отличает от стандартных колб широкое горлышко в сочетании со специальной газопроницаемой крышкой, что способствует поступлению большего количества кислорода. Колбы Thomson обладают особым дизайном и характеристиками, которые позволяют использовать до 60% от общего объема колбы без потери эффективности культивирования. Благодаря своим компактным размерам они в значительно большем количестве размещаются в шейкере-инкубаторе. Кроме того, оба производителя предлагают одноразовые крышки для асептического переноса инокулята непосредственно в биореактор, что упрощает и ускоряет процедуру засева.

Согласно полученным результатам (рис. 43), скорость роста в колбах Thomson примерно в 1,5 раза выше, чем при культивировании в колбах Corning и сопоставима с скоростью роста в одноразовом мешке Cellbag. Очевидно, это связано с особенностями геометрии. Кроме того, было отмечено, что при одинаковой скорости перемешивания конструкция колб Thomson способствует меньшему пенообразованию по сравнению с Corning.

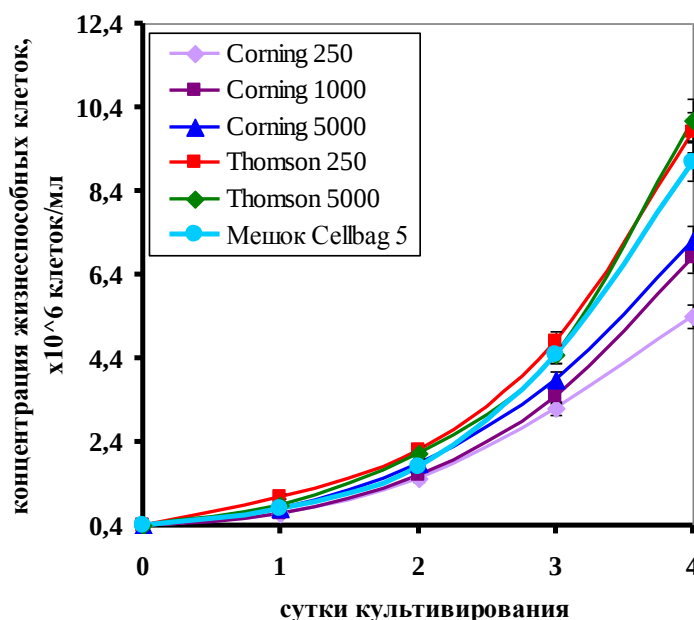


Рисунок 43 – Сравнение эффективности культивирования инокулята в разных условиях

Таким образом, для подготовки инокулята было предложено использовать колбы Thomson, которые являются эффективной альтернативой одноразовых

мешков для более выгодной, быстрой и качественной подготовки посевного материала.

3.2.3.2 Сравнение эффективности культивирования в условиях механического и волнового перемешивания

Процессы культивирования проводили в стеклянных биореакторах с механическим перемешиванием Labfors (Infors НТ, Швейцария) и Applikon (BioBundle, Нидерланды) с рабочим объемом 3,5 л и 5 л, соответственно, а также в биореакторе волнового типа AppliFlex (Applikon, Нидерланды) с использованием одноразовых мешков на 10 л.

Для клеток, культивировавшихся в биореакторах с механическим перемешиванием было отмечено значительное снижение скорости клеточного роста, по сравнению с культивированием в волновом биореакторе. Кроме того, в первом случае просматривалось более резкое снижение жизнеспособности клеток в зависимости от дня культивирования. Длительность процесса составляла от 9 до 11 дней, концентрация жизнеспособных клеток достигала максимум 30×10^6 кл/мл. Возможно, снижение жизнеспособности клеток было обусловлено их травмированием при перемешивании (механический стресс), что отразилось также и на профиле накопления лактата в культуральной жидкости, т.е. на 6-7 дни культивирования наблюдали повышение лактата больше 2-3 г/л. Снижение темпа роста, жизнеспособности клеток и высокое содержание лактата привели к уменьшению концентрации моноклонального антитела в культуральной жидкости на последние сутки. Попытки подобрать скорость перемешивания оказались безуспешными (данные не приведены). По результатам культивирования в биореакторах Labfors и Applikon концентрация мАТ адалимумаб составила $(0,8 \pm 0,3)$ г/л против $(1,5 \pm 0,1)$ г/л в колбах.

При исследовании процесса культивирования в волновом биореакторе AppliFlex (Applikon, Нидерланды) с использованием одноразовых мешков на 10 (рис. 44) и 50 л (рис. 45) было показано, что продолжительность цикла культивирования составляет 13 суток.

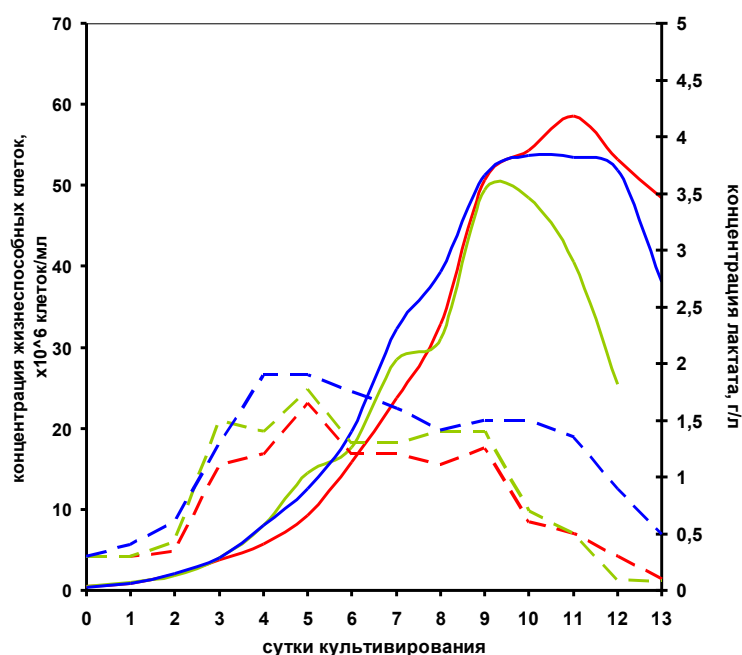


Рисунок 44 – Кривые роста клеточной линии, экспрессирующей моноклональное антитело адалимумаб, в цикле продукции с подпиткой в биореакторе волнового типа AppliFlex (Applikon, Нидерланды) объемом 10 л (3 серии). Пунктиром обозначены профили накопления лактата соответствующим цветом

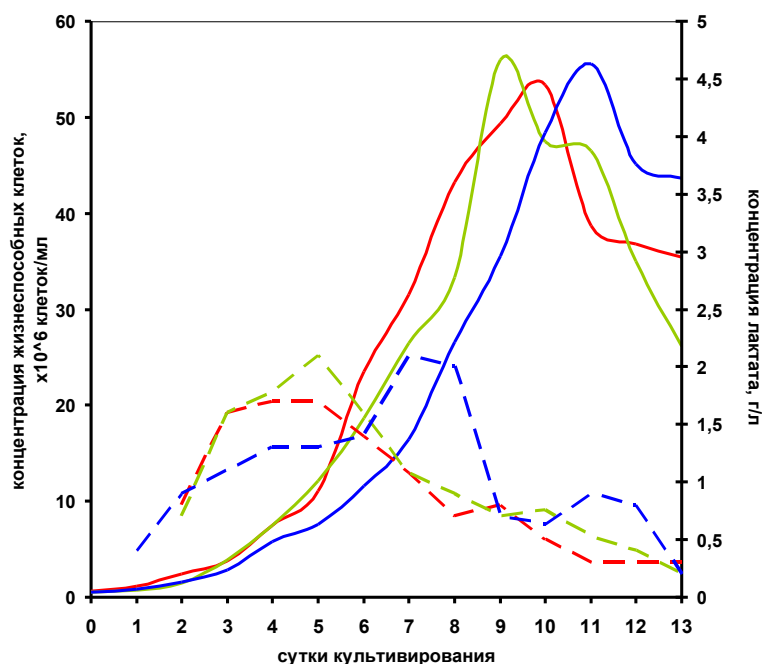


Рисунок 45 – Кривые роста клеточной линии, экспрессирующей моноклональное антитело адалимумаб, в цикле продукции с подпиткой в биореакторе волнового типа AppliFlex (Applikon, Нидерланды) объемом 50 л (3 серии). Пунктиром обозначены профили накопления лактата соответствующим цветом

Максимальное значение клеточной плотности $(54,4 \pm 2,8) \times 10^6$ клеток/мл достигается на 9-11 сутки культивирования. При этом выработка лактата клетками в ходе данного процесса составляла не больше 2 г/л, а выход целевого продукта на последние сутки $(1,54 \pm 0,2)$ г/л.

Таким образом, показано, что разработанная технология культивирования клеточной линии CHO-DHFR-ADMB26 в малом объеме успешно реализуется и воспроизводится в биореакторах с волновым перемешиванием с сохранением уровня продуктивности. Показано, что культивирование клона-продуцента в реакторе волнового типа обеспечивает более благоприятные условия, чем в реакторе с механическим перемешиванием.

Наряду с успешным масштабированием разработанной технологии в реакторах разного типа было предложено исследовать влияние температурного режима при культивировании в реакторе на продуктивность, так как из-за чрезвычайно высокой плотности клеток, достигаемой клеточной линии CHO-DHFR-ADMB26 в цикле продукции с подпиткой, было затруднительно использовать данный подход в колбах. Процесс был более короткий и эффекта увеличения выхода продукта не получили в этом случае, скорее всего благодаря плохому массопереносу. Кроме того, на данном этапе, появилась возможность провести процесс в реакторе с орбитальным типом перемешивания.

3.2.3.3 Выбор температурного режима

Культивирование осуществляли в стеклянном биореакторе с механическим перемешиванием Labfors (Infors HT, Швейцария) рабочим объемом 7 л, в биореакторе волнового типа AppliFlex (Applikon, Нидерланды) и орбитальном биореакторе Kühner SB10X (Kühner AG, Швейцария), для двух последних использовали одноразовые мешки с рабочим объемом 10 л. При достижении клеточной плотности свыше 20×10^6 клеток/мл снижали температуру с 37 до 33 °C.

В волновом биореакторе AppliFlex продолжительность цикла культивирования составила 17 суток. Максимальное значение клеточной плотности было достигнуто на 12 день культивирования и составило около $55,5 \times 10^6$ клеток/мл (рис. 46). При этом, выработка лактата клетками в ходе данного процесса была минимальной (рис. 47), а выход целевого продукта на последние сутки составил $(1,9 \pm 0,2)$ г/л.

В случае клеток, культивировавшихся в биореакторе с механическим перемешиванием и орбитального типов, отмечено небольшое снижение скорости клеточного роста, по сравнению с волновым биореактором. Кроме того, в данных случаях просматривалось более резкое снижение жизнеспособности клеток в зависимости от дня культивирования (рис. 46). В результате культивирования в биореакторах Labfors и Kühner SB10X максимальная клеточная плотность достигла 40 млн клеток/мл на 16 и 9 дни (рис.46), соответственно, а продуктивность составила $(1,6 \pm 0,1)$ и $(1,4 \pm 0,1)$ г/л.

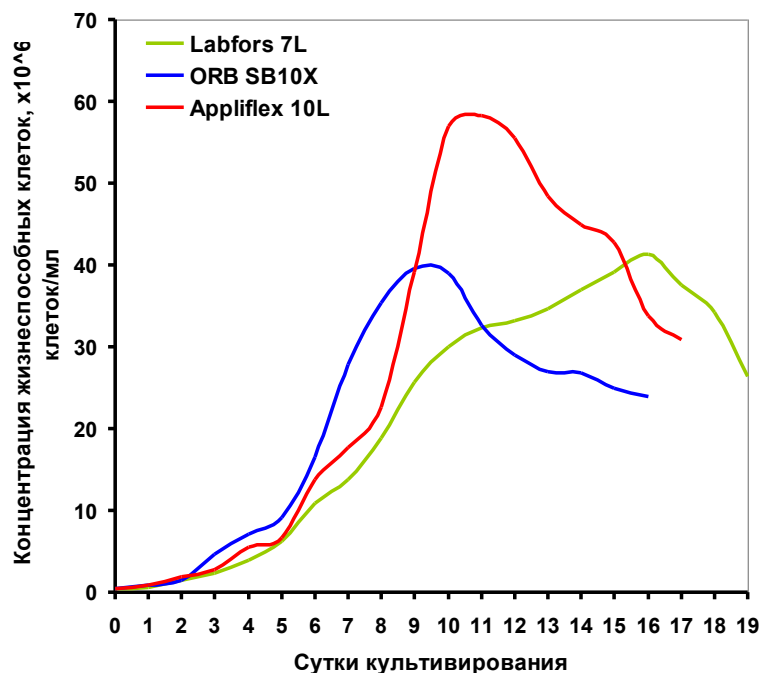


Рисунок 46 – Кривые роста клеточной линии, экспрессирующей моноклональное антитело адалимумаб, в цикле продукции с подпиткой в биореакторах разного типа

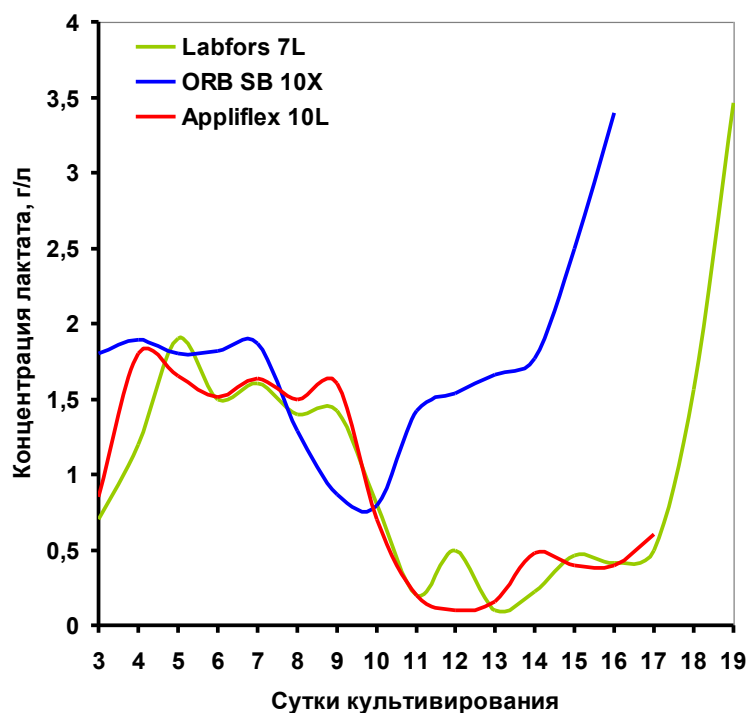


Рисунок 47 – Профиль накопления лактата клеточной линии, экспрессирующей моноклональное антитело адалимумаб, в цикле продукции с подпиткой в биореакторах разного типа

Анализируя полученные результаты, следует заключить, что изменение температурного режима культивирования позволило увеличить длительность культивирования и существенно повысить выход целевого продукта во всех типах биореакторов, однако наиболее эффективным для данной клеточной линии является культивирование в биореакторе волнового типа. Важно отметить, что профиль гликозилирования продукта, несмотря на изменения режима культивирования, не изменился и дополнительная корректировка не потребовалась. Наряду с этим ведение процесса в биореакторе волнового типа AppliFlex подразумевает использование одноразовых технологий, что соответствует современным тенденциям биотехнологии и правилам GMP.

В таблице 19 приведены сводные данные по общей продуктивности и длительности культивирования в разных типах биореакторов.

Таблица 19 – Сводные результаты по культивированию в разных типах биореакторов

Платформа									
	Labfors	Applikon	AppliFlex		Labfors	AppliFlex		Kühner SB10X	
Объем биореактора, л	7	7	10	50	7	10	50	10	50
Тип перемешивания	механический		волновой		механический	волновой		орбитальный	
Температурный режим	37°C				снижение с 37 до 33 °C				
Выход антитела в КЖ, г/л	0,8±0,3		1,5±0,2		1,6±0,1	1,9±0,2		1,4±0,1	
Длительность, дни	9-11		13		19	17	19	16	

3.2.3.4 Фильтрация и осветление культуральной жидкости, содержащей моноклональное антитело адалимумаб

Процесс осветления и фильтрации культуральной жидкости является критическим моментом в разработке технологии. Так как сегодня фильтрация является отличной альтернативой центрифугированию благодаря более простой реализации и масштабированию, процедура подготовки культуральной жидкости для выделения продукта и его очистки стала более эффективной и простой.

Следует осуществить несколько попыток методом подбора конкретных продуктов фильтров разных производителей и оптимизацию последовательности использования фильтрующих единиц для наиболее эффективного процесса. Выбор таковых в нашем случае был в пользу зарекомендовавшей себя на рынке компании Sartorius по следующим критериям: скорость потока, общая пропускная способность, потери при фильтрации, химическая совместимость (материал фильтра), размер пор/границы отсечения, число стадий.

Первый этап очистки продукта заключался в осветление культуральной жидкости, задачей которого является максимальное удаление крупных частиц, таких как клетки и дебриса. На данном этапе было предложено несколько решений в пользу глубинной фильтрации: на основе Sartoclear PB1 (11-4 мкм), с использованием последовательного сочетания

PB1 (11-4 мкм) и PB 2 (8-1 мкм), и PB1 (11-4 мкм) наряду с достаточно новой разработкой Sartorius PP3 (1.2 мкм). В нашем случае следовало учесть, что благодаря хорошим ростовым характеристикам клеточной линии концентрация клеток в культуральной жидкости за процесс была чрезвычайно высокая. В связи с этим, использование одного фильтра Sartoclear PB1 на стадии предстерилизующей фильтрации затрудняло процесс удаления клеток и дебриса, и, следовательно, требовало использования дополнительных единиц (рис. 48). Однако, сравнивая варианты сочетания PB1 наряду с PB 2 и PP3, удалось повысить эффективность процесса фильтрации, но с некоторой потерей в объеме КЖ в случае комбинации PB1 и PP3 (рис. 48).

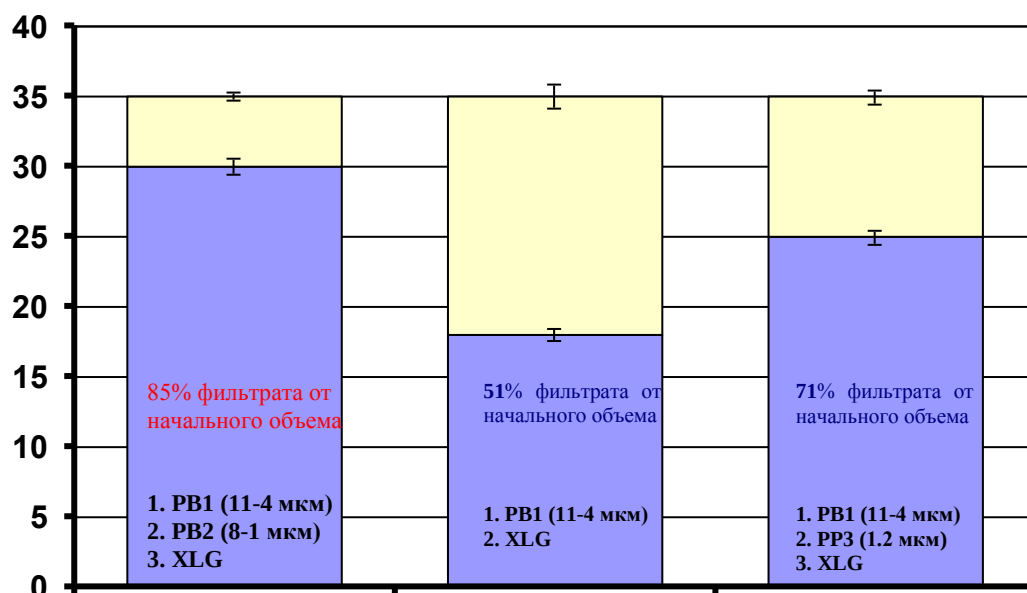


Рисунок 48 – Сравнение эффективности подготовки культуральной жидкости на стадии выделения и очистки продукта с использованием сочетания фильтрующих единиц с разной пропускной способностью. Начальный объем культуральной жидкости 35 ± 2 л.

На втором этапе во всех случаях осуществляли стерилизующую фильтрацию непосредственно с использованием фильтра с широкой химической совместимостью Sartopore 2 XLG (0.8+0.2 мкм) с полиэфирсульфоном и двуслойной мембраной, обеспечивающих высокую пропускную способность и скорость потока в широком диапазоне pH от 1 до

14. Данный подход является современным, эффективным и очень популярным в применении.

Таким образом, следует заключить что эффективность отделения клеток и дебриса на стадии предстерилизующей фильтрации зависит от выбранных единиц или их комбинации и существенно влияет на скорость и стоимость этапа подготовки продукта к выделению и очистке. Было показано, последовательное использование Sartoclear PB1, PB 2 и Sartopore 2 XLG упрощает процедуру и обеспечивает сохранение объема фильтрата до 85% от начального (рис. 48).

3.2.4 Оценка биоподобия мАТ адалимумаб

3.2.4.1 Анализ профиля гликозилирования мАТ адалимумаб при культивировании в выбранных условиях

Последний этап разработки технологии культивирования клеточной линии CHO-DHFR-ADMB26 для производства мАТ адалимумаб заключался в анализе качества антитела наработанного в реакторе волнового типа Appliflex.

Таким образом, сочетание сред Dynamis и ActiCHO в пропорции 12:1, соответственно, в условиях культивирования продуцента в биореакторе Appliflex с периодическим добавлением подпитки CellBoost 7a/b и 60 Мм сахарозы обеспечивает профиль гликозилирования биоподобного мАТ адалимумаб аналогичный оригинальному в рамках его изменчивости (рис. 49) с сохранением продуктивности ($1,9 \pm 0,2$) г/л при двухфазном температурном режиме.

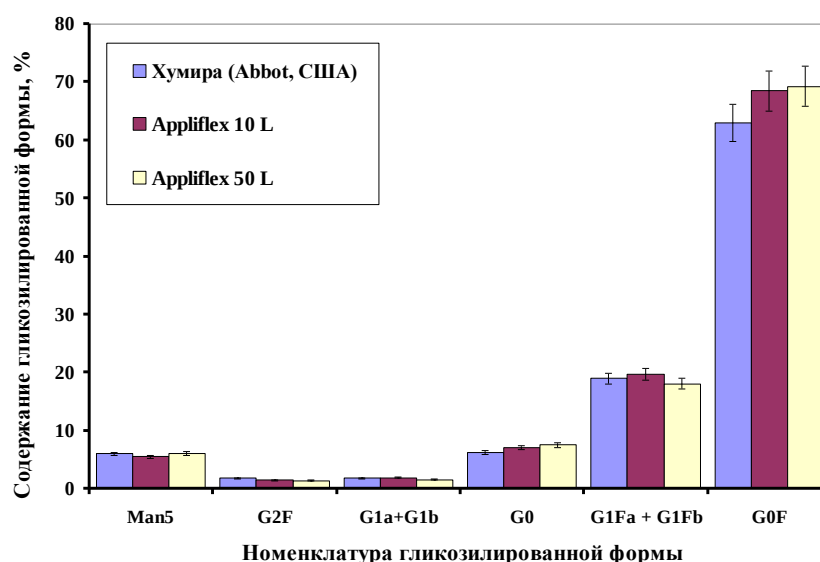


Рисунок 49 – Содержание гликозилированных форм биоподобного мАТ, полученного при культивировании в биореакторе Appliflex в Dynamis и ActiCHO Р 12:1 с периодическим добавлением подпитки CellBoost 7a/b и 60 Мм сахарозы в условиях двухфазного температурного режима в сравнении с оригинальным мАТ адалимумаб

3.2.4.2 Оценка биологической активности биоподобного мАТ адалимумаб в сравнении с оригинальным

Наряду с профилем гликозилирования, полученное антитело исследовали на проявление способности ингибировать токсичное влияние ФНО-альфа на клетки. Исследование биологической активности моноклонального антитела адалимумаб проводили с использованием клеточной линии WENI164, чувствительной к ФНО-альфа.

На первом этапе осуществляли посев клеток линии WENI164 в 96-луночные планшеты в ростовой среде. Планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37 °С в течение суток. За данное время клетки прикреплялись к субстрату и приобретали свойственные данной культуре фибробластоподобный и лимфобластоподобный фенотипы. На второй день для повышения чувствительности к ФНО-альфа клетки инкубировали в ростовой среде, содержащей антибиотик актиномицин Д в течение 3 часов. Затем удаляли среду с антибиотиком и вносили среду с ФНО-альфа и антителами, ингибирующими его действие. В дополнительном 96-луночном планшете готовили последовательные двукратные разведения нашего антитела и препарата Хумира в качестве стандартного образца. Клетки инкубировали с ФНО-альфа, испытуемым и референсным образцом в течение суток в CO₂-инкубаторе при 37 °С. Изменение оптической плотности связанное с уменьшением пролиферации клеток измеряли на планшетном спектрофотометре с использованием флуоресцентного красителя WST-1 (рис.47).

Согласно полученным результатам можно сделать вывод, что моноклональное антитело, экспрессируемое клеточной линией CHO-DHFR-ADMB26, не уступает препарату-оригинатору *in vitro* в способности ингибировать токсичное влияние ФНО-альфа на клетки в качестве проявления биологической активности на клеточной линии WENI164.

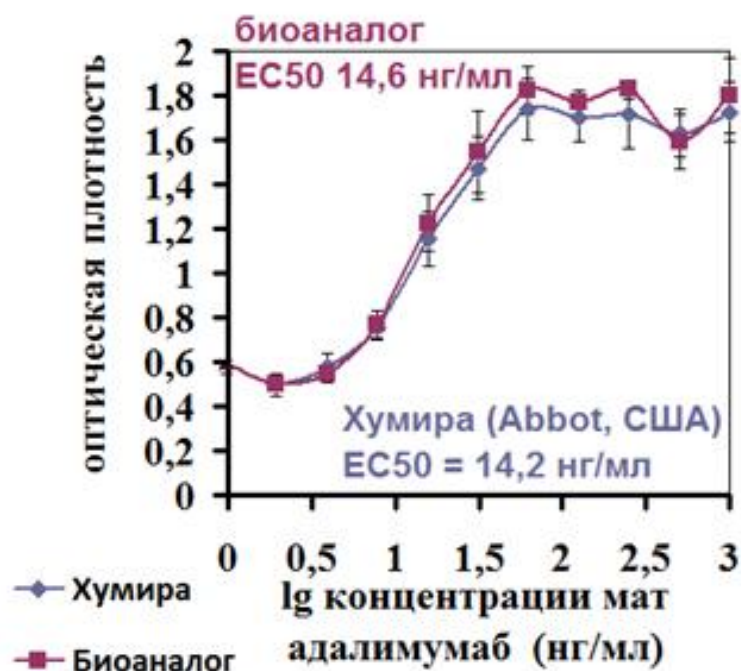


Рисунок 50 – Зависимость среднего показателя оптической плотности от концентрации исследуемого антитела и Хумиры в качестве стандартного образца

3.2.4.3 Оценка заряженных изоформ биосимилярного мАТ адалимумаб в сравнении с оригинальным

Важно отметить, что в процессе культивирования клеточная линия продуцирует антитело, обладающее гетерогенностью по таким параметрам, как размер молекулы и её заряд. FDA установлено, что гетерогенность по лизиновым формам антител не влияет на профили безопасности и эффективности терапевтической молекулы. Кроме того, есть данные по различным биосимилярным продуктам моноклональных антител, в которых описан и подтверждается установленный факт [258-262]. Например, в публикации о масштабном исследовании Ремсимы (Mundipharma, Германия) в сравнении с Ремикейдом (Сентокор Б.В., Нидерланды) отмечают различия по содержанию лизиновых форм в сравнении с оригинатором, что является некритичным, т.к. лизины *in vivo* быстро откусываются карбоксипептидазой.

Известно, что при нахождении в культуральной жидкости антитело подвергается превращениям и деградации по разным механизмам,

включающим окисление, дезаминирование, изомеризацию и фрагментацию, что приводит к образованию вариантов с разным значением изоэлектрической точки [254, 255]. Отщепление остатка С-концевого лизина тяжелой цепи антитела, дезаминирование белка по остаткам аспарагина и сиалирование гликанов увеличивает суммарный отрицательный заряд молекулы антитела, что снижает pI и, следовательно, приводит к образованию кислых вариантов антитела [256]. Другим механизмом появления кислых изоформ антитела служит образование ковалентных аддуктов, например, путем реакции гликирования (реакция между глюкозой/галактозой и амино-группами остатков лизина). Что касается щелочных изоформ антител, то их образование происходит при сохранении остатков лизина в С-концевой области антитела, аминировании остатков глицина, образовании сукцинимидов, окислении некоторых аминокислот или отщеплении сиаловых кислот, все эти модификации вносят дополнительный позитивный заряд в молекулу антитела и увеличивают pI [256].

Хотя влияние всех перечисленных выше модификаций на биологическую активность и фармакокинетические параметры не до конца понятно [256-258] при разработке технологии крайне важно проводить характеризацию гетерогенности получаемого антитела, поскольку этот параметр служит индикатором стабильности и воспроизводимости процесса. При получении биосимилярного моноклонального антитела крайне важной является задача характеристики получаемого продукта в сравнении с оригинатором. В связи с этим, необходимо было оценить степень различия состава заряженных изоформ при сравнении разработанной молекулы биосимиляра мАТ адалимумаб и оригинального антитела.

Наиболее часто применяемыми для осуществления данной задачи методами служат те, которые позволяют эффективно разделить изоформы антитела, гетерогенные по заряду. К ним относятся катионообменная хроматография, изоэлектрическое фокусирование, капиллярный электрофорез.

Таким образом, проводили обработку субстанции мАТ адалимумаб совместно с препаратом-оригинатором Хумира с использованием ферментов карбоксипептидазы В и N-гликозидазы F с последующим анализом заряженных форм антител методами изоэлектрического фокусирования и катионообменной хроматографии. Изоэлектрическое фокусирование осуществляли на системе MultiphorII (GE Healthcare, Великобритания) с использованием смеси фармалитов pH 3-10 (GE Healthcare, Великобритания). Нагрузка по белку составляла 30 мкг на дорожку. После завершения фокусирования осуществляли фиксирование белков в геле с последующей отмывкой и окрашиванием раствором Кумасси R250. Результаты анализа представлены на рисунке 51.

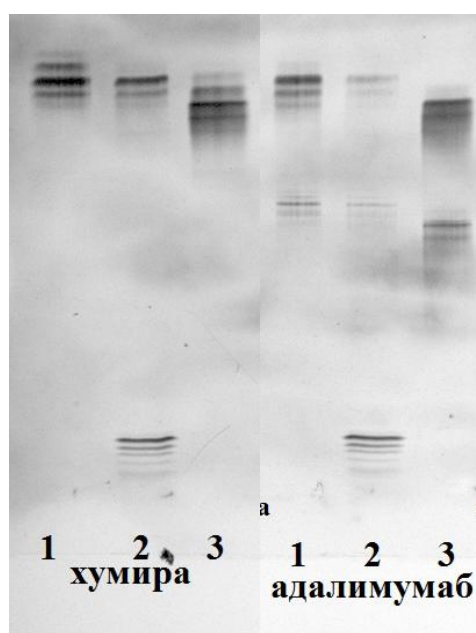


Рисунок 51 – Изоэлектрофореграмма образцов мАТ адалимумаб
1 – оригинальное антитело; 2 – обработанное карбоксипептидазой; 3 –
обработанное N - гликозидазой

В оригинальном мАТ адалимумаб без ферментативной обработки детектируется 5 полос, соответствующих заряженным изоформам, в исследуемом образце биосимиляра – 4 полосы, различие состоит в количестве и интенсивности верхних (относительно основной) полос, соответствующих щелочным изоформам антитела. После обработки обоих антител карбоксипептидазой В на изоэлектрофореграмме не детектируются верхние

щелочные изоформы антитела, таким образом, обработка данным ферментом позволила полностью отщепить остатки лизинов на С-концевом участке тяжёлой цепи. Обработка обоих образцов антитела N-гликозидазой F привела к сдвигу профиля всех изоформ в кислую область, данный факт возможно обусловлен образованием остатка аспарагиновой кислоты в положении 297 тяжелой цепи антитела после отщепления гликанов. Идентифицировать полосы, соответствующие кислым изоформам антитела, после обработки образцов N-гликозидазой F было затруднительным, ввиду размытости полос в этой области.

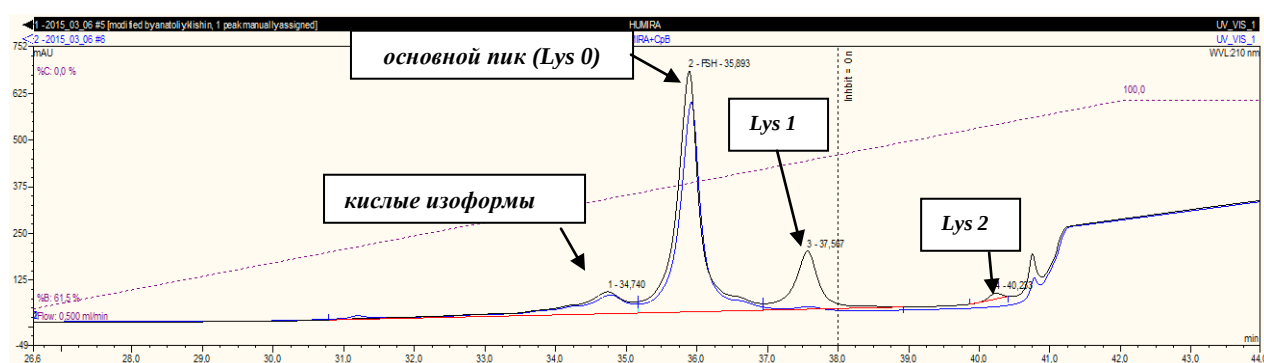
Полосы, расположенные в нижней области электрофореграммы и детектируемые во всех образцах антител после обработки карбоксипептидазой В, вероятнее всего, соответствуют ферменту.

Полученные результаты соответствуют таковым после анализа образцов методом ИЭФ. При наложении хроматограмм оригинала и биоаналога, детектировано отсутствие пиков лизиновых ироформ (Lys-1 и Lys-2) в случае обработки карбоксипептидазой В (рис. 52 А). Обработка N-гликозидазой F приводит к смещению хроматограммы в левую область – так, время выхода пика основной формы антитела уменьшилось на 2,1 мин, по сравнению с контролем (рис. 52 Б).

На хроматограмме необработанного образца детектируется один пик в щелочной области, соответствующей форме с 1 концевым остатком лизина, после обработки карбоксипептидазой В данный пик исчезает (рис. 53 А). На этих же хроматограммах левее основного пика детектируются два пика, соответствующие кислым изоформам антитела. После обработки N-гликозидазой F самый левый пик исчезает (рис. 53 Б), вероятнее всего, он соответствует сиазированной форме адалимумаба. Однако второй пик сохраняется, предположительно, он соответствует дезаминированным формам антитела. Как и в случае Хумиры, обработка N-гликозидазой F приводит к смещению хроматограммы в левую область, по сравнению с контролем (разница во времени выхода основного пика – около 2 мин).

В образце мАТ адалимумаб, по сравнению с оригинатором, детектируется малое количество щелочной изоформы, содержащей 1 остаток С-концевого лизина и полное отсутствие изоформы с 2 остатками лизина (рис. 51). Стоит отметить различие и в содержании кислых изоформ: так, в образце мАТ адалимумаб, помимо дезаминированных форм (содержащихся также в Хумире) детектирована сиалирированная форма, которая исчезает при обработке N-гликозидазой F (см. описание выше).

А



Б.



Рисунок 52 – Хроматограммы образцов Хумиры после катионообменной хроматографии: А – контроль и обработка карбоксипептидазой В, Б – обработка N-гликозидазой. Оригинальное антитело обозначено черным цветом, синим цветом – биосимилярное мАТ адалимумаб

Таким образом, обработка биоподобного антитела совместно с оригинальным карбоксипептидазой В позволила отщепить остатки С-концевых лизинов. Данный факт был подтвержден двумя методами анализа – ИЭФ (по уменьшению числа полос в щелочной области на электрофореграмме) и ИОХ (по уменьшению числа пиков в правой области хроматограммы).

А



Б

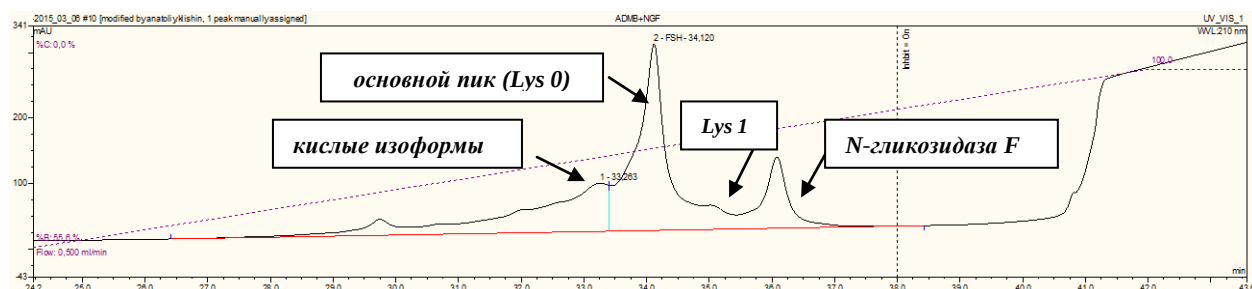


Рисунок 53 – Хроматограммы образцов элюата адалимумаба после катионообменной хроматографии: А – контроль и обработка карбоксипептидазой В, Б – обработка N-гликозидазой F

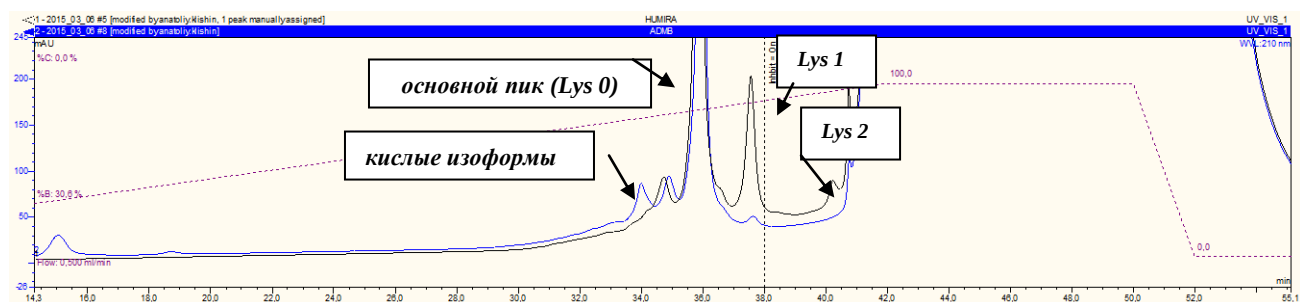


Рисунок 54 – Хроматограммы образцов адалимумаба после катионообменной хроматографии в сравнении с оригинатором

Обработка N-гликозидазой F привела к смещению полос на изоэлектрофореграмме в кислую область (по данным ИЭФ) и пиков на хроматограмме в левую часть (по данным ИОХ). Как было показано, данный факт обусловлен изменением заряда молекулы антитела после отщепления гликанов – образованием остатка аспарагиновой кислоты в положении 297 тяжелой цепи антитела.

Несмотря на некоторые различия в составе заряженных изоформ в ряде доклинических исследований было подтверждено, что на эффективность и безопасность полученного антитела это не влияет. В исследованиях сравнительной токсичности при многократном подкожном введении с изучением токсикокинетики, иммуногенности и местнораздражающего действия препарата адалимумаб (ООО «ФАРМАПАРК», Россия) и референтного препарата Хумира (Веттер Фарма, Германия) у яванских макак было сделано заключение о том, что тестируемый препарат адалимумаб (производства ООО «ФАРМАПАРК»), при многократном внутримышечном введении яванским макакам не отличается по исследуемым показателям от зарегистрированного на территории РФ препарата сравнения Хумира (Веттер Фарма, Германия), и может быть рекомендован для проведения клинических исследований. Эффективность тестируемого препарата адалимумаб (производства ООО «ФАРМАПАРК») в сравнении с оригинальным так же была подтверждена в исследованиях на модели артрита на трансгенных мышцах Tg197

3.2.5 Технологическая схема процесса и материальный баланс

Разработанная технология культивирования включает несколько базовых стадий (рис. 55). Подготовительным этапом для каждой стадии служит приготовление необходимых растворов и питательных сред.

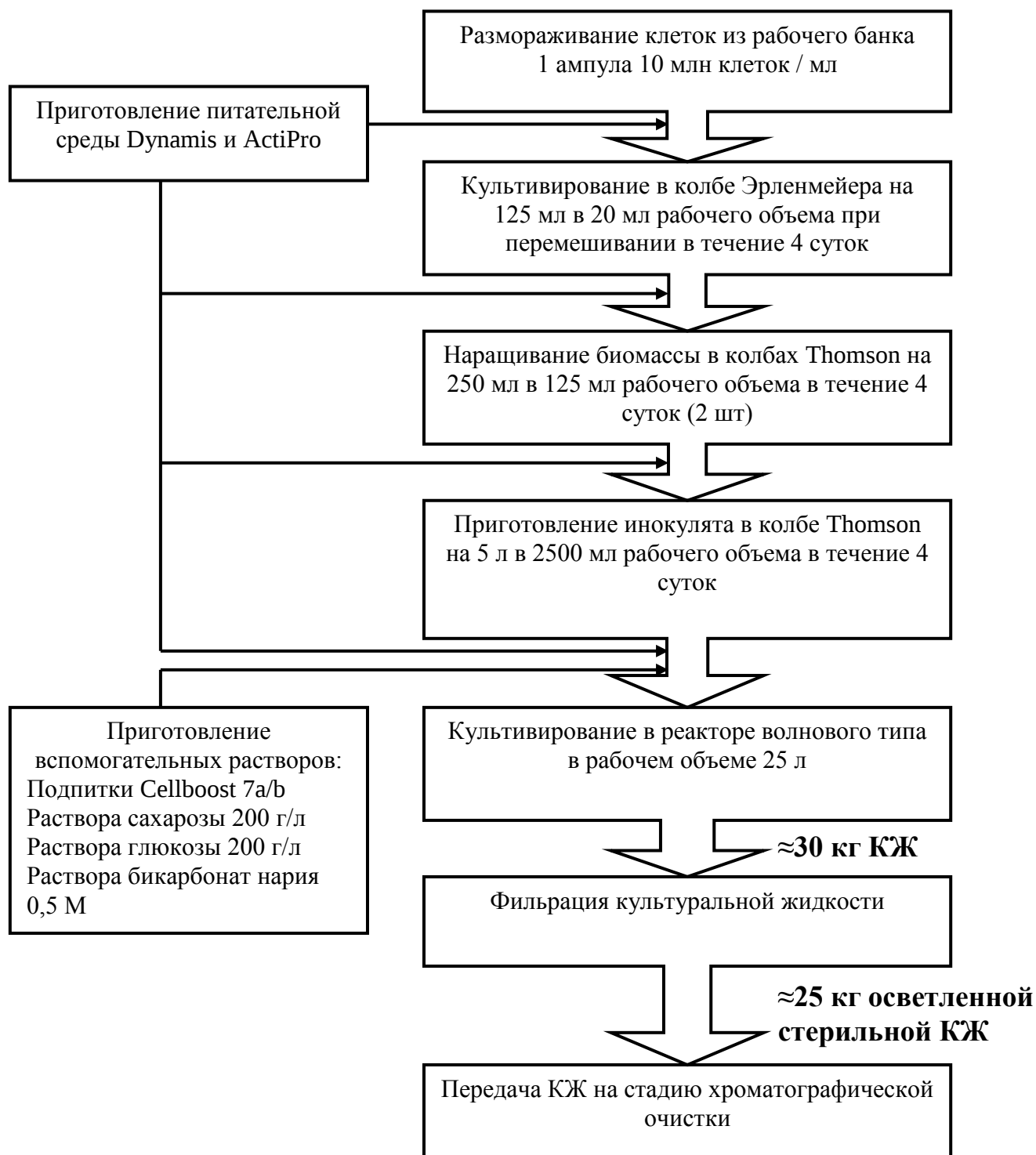


Рисунок 55 – Технологическая схема разработанного процесса

Процесс культивирования начинают с размораживания пробирки из рабочего банка клеточной линии CHO-DHFR-ADMB26. Размороженную суспензию клеток помещают сразу в колбу Эрленмейера на 125 мл в 20 мл рабочего объема, содержащую полную среду для культивирования. Биомассу наращивают в течение 4 суток в условиях с 5%-ным содержанием CO₂, при температуре 37 °С, относительной влажности 95% и перемешивании 125 об/мин. При достижении клеточной плотности около $(5,0 \pm 1,5) \times 10^6$ клеток/мл и жизнеспособности не менее 95% осуществляют пересев всего объема КЖ в колбы Thomson на 250 мл в 125 мл рабочего объема в плотности не менее $0,5 \times 10^6$ клеток/мл и культивируют в течение 4 суток. Для приготовления инокулята полученный объем КЖ переносят в колбу Thomson на 5 л с рабочим объемом 2,5 л в плотности $(0,5 \pm 0,1) \times 10^6$ клеток/мл и осуществляют культивирование при перемешивании со скоростью 70-80 об/мин в течение 4-х суток. Для засева волнового биореактора на 50 л (мешка с рабочим объемом 25 л) в плотности не менее $(0,5 \pm 0,1) \times 10^6$ клеток/мл полученный инокулят асептически переносят в мешок для культивирования в среде Dynamis и ActiCHO в соотношении 12:1.

Расчет объема клеточной биомассы для засева мешка проводится следующим образом (исходя из общего объема суспензии в колбе на 5 л равного 2500 мл):

- требуемое число клеток для засева мешка

$$N_{\text{тр}} = 0,5 \times 10^6 \text{ клеток / мл} \times 25000 \text{ мл среды} = 12,5 \times 10^9 \text{ клеток};$$

- общее число клеток

$$N_{\text{общ}} = 2500 \text{ мл} \times \text{КП}_{\text{колба Thomson 5л}},$$

- процент использования биомассы

$$P = N_{\text{тр}} / N_{\text{общ}};$$

- объем биомассы (клеточной суспензии) для засева мешка

$$V_{\text{бм}} = 2500 \text{ мл} \times P$$

В мешок с полной питательной средой переносят рассчитанное количество биомассы ($V_{\text{бм}}$).

Культивирование осуществляют в условиях двухфазного температурного режима путем снижения температуры культивирования с 37 до 35 °C при плотности больше 20×10^6 клеток/мл, затем до 33 °C через 7-16 часов, значение pH и содержание растворенного кислорода (DO) поддерживают на уровне $(7,0 \pm 0,2)$ и (40 ± 10) %, соответственно. Регуляция pH осуществляют с помощью подачи CO_2 и 0,5 М NaHCO_3 (Sigma-Aldrich, США). Регуляцию уровня растворенного кислорода в начале процесса осуществляли азотом и воздухом, затем воздухом и кислородом по мере увеличения концентрации жизнеспособных клеток и скорости потребления кислорода. Культивирование проводят при скорости перемешивания 25 rpm, при этом угол наклона платформы составлял 8 градусов. Смесь газов подают в пространство над КЖ. Начиная с 3 суток культивирования, проводят ежедневный отбор проб для определения количества и жизнеспособности клеток и концентрации метаболитов. При необходимости добавляют глюкозу до концентрации (5 ± 1) г/л, учитывая ее содержание в подпитке и скорость метаболизма клеток. Подпитки вносят каждые сутки, начиная с третьего дня культивирования через насос контроллера. Важно отметить, что подпитка Cellboost комплексная, в связи с этим сначала вносят компонент Cellboost 7b, затем осуществляют порционную подачу через насос в течение суток Cellboost 7b. Сахарозу вносят с третьего дня по 5 Мм, всего 60 Мм за весь процесс. Культивирование продолжают до снижения жизнеспособности ниже 70%. После окончания культивирования проводят осветление и стерилизацию КЖ путём фильтрации, затем КЖ передают на стадию хроматографической очистки.

Материальный баланс по сырью, полупродуктам и отходам для разработанной технологии культивирования представлен в таблице 20.

Таблица 20 – Материальный баланс стадии культивирования клеток-продуцентов мАТ адалимумаб

<i>Израсходовано</i>		<i>Получено</i>	
Наименование сырья и полупродуктов	Значение, кг	Наименование конечного продукта, отходов и потерь	Значение, кг
А) сырье:		А) Полупродукты:	
1. суспензия клеток	0,0010	1. Суспензия клеток	3,7800
2. питательная среда	27,800	2. Культуральная жидкость	33,557
3. аланил-глутамин	0,5560	Б) Отходы: 1. Использованные растворы и КЖ после пересева клеток	0,010
4. Cellboost 7a	5,6250		
5. Cellboost 7b	0,5625		
6. вода очищенная	0,1800		
7. глюкоза	2,0575		
8. сахароза	0,515		
9. бикарбонат натрия	0,050		
Итого:	37,347	Итого:	37,347

3.2.6 Экономическая эффективность процесса

Процесс культивирования клона-продуцента в биореакторе волнового типа включает затраты на материалы (питательная среда и добавки к ней, мешки для культивирования, лабораторный пластик), оборудование, оплату труда сотрудников, а также аренду помещений и коммунальные платежи. Возможное количество запусков культивирования в биореакторе – 14 процессов в год, учитывая, что цикл культивирования составляет 17 дней. Стоимость оборудования, используемого в процессе, составляет около 5 млн. рублей. Для расчёта амортизации оборудования используется линейная модель сроком на 10 лет. Оплата аренды и коммунальных платежей приведены для помещения площадью около 30 м².

Для обслуживания процесса необходимы следующие трудовые ресурсы: инженер-технолог (1 ставка) и лаборант (0,5 ставки). В табл. 21 проведена сводная смета расходов на процесс культивирования на период продолжительностью 1 год.

Таблица 21 – Расчёт годовых затрат на культивирование продуцента мАТ адалимумаб в биореакторе волнового типа объемом 50 л

Расходная статья	Затраты на 1 год, руб.
Материалы и среды	4 500 000
Амортизация оборудования	1 500 000
Обслуживание процесса	2 400 000
Аренда и коммунальные платежи	900 000
ИТОГО	9 300 000

В разрабатываемой технологии используется биореактор волнового типа с рабочим объемом 30 л. Поскольку за год максимально возможное количество процессов запуска биореактора составляет 14, то суммарно наработанный объем КЖ составляет около 420 л. Средняя продуктивность процесса культивирования в биореакторе составляет 1,5 г/л, соответственно, за год возможно наработать примерно 0,630 кг мАТ адалимумаб.

Исходя из приведенных выше данных, а также принимая во внимание возможные потери процесса, себестоимость культивирования для получения

1 г белка около 15 000 руб. Если принять стоимость проведения следующих технологических стадий (очистки, приготовления ГЛФ, характеристики аналитическими методами, розлива и упаковки) примерно равной стоимости культивирования, то общие затраты на производство 1 г мАТ в год составляют в среднем 100 000 руб.

Согласно прогнозу при общем объеме рынка на 2021 году 74 000 первичных упаковок, доля Фармапарка составит 7 400 уп. (к 2023 году – 34 000 уп.). Учитывая эффективность очистки с последующими процедурами розлива и контроля ~ 75%, можно сделать следующий расчет:

$30 \text{ кг КЖ} \times 1,5 \text{ г/л} \times 14 \times 0,75\% \text{ эффективность} = 0,472 \text{ кг}$ или 12 тыс. шприцев в год при дозировке 40 мг в шприце

Одна упаковка ГЛФ мАТ адалимумаб должна содержать 40 мг очищенного белка. На основании рассчитанных выше данных, себестоимость одной упаковки. На данный момент стоимость оригинального препарата Хумира (Abbot, США) на российском рынке составляет около 70 000 руб. Оценочная стоимость дозы производимого по описанной технологии мАТ адалимумаб составляет около 4000 руб. (стоимость препаратов-биоаналогов или дженериков обычно в 2-3 раза меньше стоимости оригинальных препаратов). Рентабельность процесса производства препарата мАТ адалимумаб по описанной технологии составляет около 1000%.

Разрабатываемый процесс культивирования в рамках технологии получения мАТ адалимумаб планируется внедрить на производственную площадку ООО «Фармапарк».

IV. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Настоящая работа была ориентирована на разработку и оптимизацию процесса культивирования эукариотической клеточной линии, созданной для получения биосимилярного полностью гуманизированного мАТ адалимумаб, как высокоэффективного биологического препарата из группы ингибиторов ФНО-альфа для лечения ревматоидного артрита и других аутоиммунных заболеваний.

Для экспрессии антитела нами была выбрана клеточная линия CHO, как хорошо изученная и наиболее широко применяемая в мире для производства гликозилированных рекомбинантных белков. Продуцент был разработан на основе сублинии CHO-DG44, не содержащей активных аллелей гена DHFR и пригодной для получения стабильных клеточных линий-продуцентов рекомбинантных белков, способной поддерживать амплификацию и высокую копийность генов интереса, содержащих селективные маркерные гены дигидрофолатредуктазы.

В качестве векторов использовали классический подход генной инженерии, подразумевающий использование доступных коммерческих конструкций pOptiVec и pcDNA, несущих в отдельности гены тяжелой и легкой цепей. Было показано, что котрансфекция векторов pOptiVEC-НС и pcDNA-LC обеспечивает количество экспрессируемого антитела в 3 раза больше, чем в случае pOptiVec-LC и pcDNA-НС. Таким образом, тяжелая цепь была в составе вектора pOptiVec наряду с геном DHFR, для усиления ее синтеза на фоне увеличивающейся концентрации метотрексата, а легкая цепь в составе вектора pcDNA с геном маркера селекции G418, что позволило сохранить клоны, корректно экспрессирующие антитело во время селекции и многочисленных раундов амплификации.

Для селекции клонов-продуцентов были использованы две стратегии отбора и амплификации. Согласно первой стратегии отбор минипулов осуществляли методом предельных разведений с их последующей

амплификацией и субклонированием. Предполагалось, преимущество такого подхода должно было заключаться на первом этапе селекции, цель которого была получить перспективные минипулы, выжившие в условиях селективного давления 500 мкг/мл антибиотика генетицина и 10 нМ метотрексата и точно содержащие гены интереса, чтобы избежать масштабную селекцию клонов, возможно, резистентных к селективным антибиотикам. Последующая амплификация была возможно только до 1 мкМ метотрексата, так как наблюдалось резкое ухудшение ростовых характеристик минипулов. Однако, в результате субклонирования нам удалось получить клоны с удельной продуктивностью от 9 до 73 пг/клетку/день, кроме того некоторые из них были исследованы на стабильность экспрессии продукта в течение двух месяцев культивирования. Культивирование выбранных клонов в цикле продукции с подпиткой показало, что все клоны росли очень медленно (время удвоения от 40 до 50 часов) и имели склонность к агрегации. Это привело к возникновению ряда трудностей в подсчете жизнеспособных клеток, возможно транспорте питательных веществ, а также продуктов из клетки. Более того, образование агрегатов существенно повлияло на ростовые характеристики, удельную скорость пролиферации и привело к снижению жизнеспособности. Несмотря на предпринятые подпитки устранения агрегирования клеток путем внесения сульфата декстрана на основе анти-клампинга в среду для культивирования, были обнаружено после первой стадии хроматографической очистки образцов культуральной жидкости значительные потери целевого белка и его агрегация. Вероятные причины возникновения такого ряда проблем мы связали с возможным нарушением корректности фолдинга белков в эндоплазматическом ретикулуме, процессинга сигнальных последовательностей и, как следствие, транспорта белковых молекул через аппарат Гольджи к плазматической мембране, что могло бы привести к их накоплению во внутриклеточном пространстве и подавлению секреции в культуральную жидкость. Однако, результаты ЭФ образцов КЖ и

супернатанта после лизиса клеток по стандартной методике Лэммли и секвенирование кодирующих последовательностей легкой и тяжелой цепей антитела из геномной ДНК подтвердили эффективность экспрессии и исключили вероятные ошибки сигнальных последовательностей. Таким образом, продуценты, полученные согласно первой стратегии не рассматривали далее в целях сохранить время на этапах разработки клеточной линии.

Согласно второй стратегии амплифицировали общий пул трансфецированных клеток с последующим отбором клонов методом предельных разведений. Такой подход позволил существенно сократить время по сравнению с первым. В этом случае нам удалось амплифицировать пул до 5 мкМ с сохранением ростовых характеристик. В конечном счете мы получили 7 перспективных клонов-продуцентов с удельной продуктивностью от 20 до 35 пг/клетку/день, которые исследовали на стабильность экспрессии в течение двух месяцев. Клоны оказались стабильны, однако, выбрать конкретный в качестве будущей клеточной линии было затруднительным, так как на одной среде не наблюдалось существенного различия по уровню удельной продуктивности. В связи с этим на данном этапе, благодаря доступному разнообразию коммерческих сред, рекомендуемых производителями для суспензионного культивирования клеток СНО, адаптировали клоны-продуценты на линейку сред и сравнили их ростовые характеристики и продуктивность, как в коротких циклах продукции, так и в рамках длительного культивирования с подпитками.

Таким образом, было показано, что среды ActiCHO и SFM4CHO в коротких циклах продукции обеспечивают высокую скорость роста и максимальное количество антитела в КЖ на последний день для всех выбранных клонов. Несмотря на довольно низкое значение удельной продуктивности около 5 пг/клетку/день на среде ActiCHO клон #26 отличался в экспериментах на других средах способностью расти в условиях очень высокой плотности в рамках длительного культивирования с подпиткой и обеспечивать

количество мАТ адалиумаб около 1 г/л, чего не наблюдалось для других клонов. Это позволило среди огромного количества клонов-продуцентов был отобран один – клон #26, обладающий наилучшими ростовыми характеристиками и уровнем экспрессии, в качестве клеточной линии продуцента CHO-DHFR-ADMB26.

С целью повышения эффективности процесса культивирования провели ряд исследований влияния состава коммерческих доступных сред и подпиток на культуральные характеристики и продуктивность клеточной линии, экспрессирующей мАТ адалиумаб. Причем в разработке мы ориентировались на способ культивирования в цикле продукции с подпитками, так как это является оптимальным решением быстрого и простого способа повысить эффективность процесса культивирования без значительного увеличения энерго- и трудозатрат.

Таким образом, в результате скрининга целого ряда сред и подпиток нам удалось повысить продуктивность клеточной линии почти в 1,5 раза до 1,6 г/л в случае использования комбинации среды Dynamis и комплексной подпитки ActiCHO Feed A/B. Кроме того, было показано, что использование сочетания сред и подпиток разных производителей оказалось более эффективным, нежели их применение в рамках одного производителя. Наряду с этим было подтверждено, как важно на этапе выбора наиболее высокопродуктивного клона осуществлять сравнительную оценку клонов не только в рамках культивирования на средах разного состава и производителей, но и в условиях длительных циклов культивирования с подпиткой.

Следует заметить, что в работе не описаны результаты использования предложенных в литературе химических агентов с целью повысить общий выход продукта. Безусловно, в работе были предложены разные схемы популярных добавок, однако они оказались неэффективны. Это очевидно, так как современные среды и подпитки для культивирования имеют богатый состав, и то, что предлагают производители для современного биофармацевтического производства является исчерпывающим.

В результате исследования качества полученного продукта в рамках изменчивости оригинального препарата было подтверждено, что одной из важных характеристик, корректировку которой можно осуществить на этапе разработки технологии культивирования, является профиль гликозилирования, определяющий как эффекторные функции молекулы, так и ее фармакокинетику.

Поэтому для выбора критериев приемлемости мы провели исследование профиля гликанов оригинального препарата и анализ биоподобного антитела, выделенного из культуральной жидкости. В результате сравнения профилей гликанов биосимиляра и оригинального препарата с учетом уровня продуктивности для дальнейших исследований было показано, что использование комбинации среды Dynamis и комплексной подпитки ActiCHO Feed A/B, обеспечивающих максимальный выход, гарантирует и довольно близкое содержание гликозилированных форм. Однако следует отметить, что в этом случае было обнаружено существенное отличие по содержанию минорного гликана Man5 – 1,7% против 6,3% в оригинальном препарате.

Помимо всего прочего, в процессе разработки технологии нам пришлось столкнуться с тем, что производитель остановил выпуск комплексной подпитки ActiCHO Feed A/B и предложил вместо нее использовать аналогичный продукт с похожим составом Cell Boost 7a/b. Использование последней подпитки не повлияло на продуктивность, это условие позволило достигнуть такого же уровня продуктивности антитела, однако в результате сравнительного анализа профиля гликанов антитела, полученного на указанных подпитках было детектировано, что CellBoost 7a/b обеспечивает худшее галактозилирование по сравнению с ActiCHO Feed A/B, вследствие чего отличие биоподобного мАТ адалимумаб от оригинального препарата по этому показателю стало более выраженным, а разница в относительном количестве минорного гликана Man5 сохранилась.

Анализируя литературные данные, мы выяснили, что нефукозилированные гликаны вносят существенный вклад в связывание

антитела с рецептором Fc-фрагментов третьего типа (FcγRIIIA), обуславливающий опосредованную антителами клеточную цитотоксичность, на поверхности макрофагов и натуральных киллеров. Таким образом, было предположено, что существенная разница в содержании нефукозилированной маннозной формы гликана Man5 может ухудшить связывание биосимилярного мАТ адалимумаб с рецептором FcγRIIIA. В связи с этим, провели сравнительный анализ на связывание мАТ адалимумаб с рецептором FcγRIII методом твердофазного ИФА, и, таким образом, подтвердили факт влияния содержания Man 5 различий в профиле гликозилирования биосимилярного и оригинального антител.

Вследствие чего стала очевидной необходимость оптимизации состава гликанов полученного мАТ адалимумаб с целью достижения близкого к оригинальному по содержанию целевой гликоформы Man5.

В результате исследования ряда добавок при культивировании на содержание гликозилированных форм биоподобного антитела предложенных в литературе нам удалось провести эффективную коррекцию маннозных гликанов путем внесения в среду ионофорного антибиотика монензина, что, к сожалению, отразилось и на ухудшении ростовых характеристик, а, вследствие этого, продуктивности клеточной линии.

Несмотря на доказанную в проведенных нами экспериментах эффективность монензина как модулятора гликозилирования, был отмечен ряд ограничений для его применения в культивировании с целью получения биофармацевтических препаратов. Во-первых, монензин требует в качестве растворителя метанола или этанола, при этом обладает низкой стабильностью при хранении в растворе. Во-вторых, данное соединение обладают токсичностью, и, хотя применяемые нами концентрации на 3-4 порядка ниже токсичных концентраций для млекопитающих, есть небольшая вероятность попадания монензина в конечный препарат. Очевидно, что применение данного соединения в биофармацевтике сопряжено с

регуляторными рисками. В связи с этим нами решено было опробовать также другие способы модификации гликозилирования антитела.

В результате других исследований было подтверждено, что содержание гликоформы Man5 в профиле гликозилирования биосимилярного моноклонального антитела может быть приведено в соответствие с содержанием гликозилированных форм в оригинальном препарате путем внесения 60 мМ сахарозы по определенной схеме, как наиболее предпочтительного агента, который позволяет сохранить культуральные характеристики и продуктивность клеточной линии.

Рекомендуемые в литературе агенты, такие как хлорид марганца, глюкозамин, хлорид натрия, повышающие долю маннозных гликанов, в нашем случае оказались неэффективными и только ухудшали процесс культивирования.

С целью оптимизации галактозилирования биосимилярного антитела исследовали образцы культуральной жидкости, полученные в первых скринингах сред и подпиток, когда оптимизировали условия культивирования для повышения продуктивности клеточной линии. Было замечено, что сочетание среды ActiCHO и подпитки ActiFeed A/B обеспечивало выраженное галактозилирование. В связи с чем, чтобы устранить разницу в содержании галактозилированных форм между биосимилярным и оригинальным мАТ, исследовали профиль гликозилирования биосимилярного антитела в результате сочетания сред Dynamis с ActiCHO в разных соотношениях. Таким образом, использование данного подхода наряду с внесением сахарозы с целью повышения доли Man5 позволило добиться нам желаемого профиля гликозилирования в соответствии с оригинальным мАТ в рамках его изменчивости.

После трудоёмких исследований, посвященных разработке технологии получения антитела заданного профиля качества в малом объеме с максимальным выходом исследовали масштабируемость технологии в разных типах биореакторов.

На этапе подготовки инокулята мы исследовали ростовые характеристики клеточной линии в разных условиях: в колбах Corning на 250, 1000 и 5000, в колбах Thomson на 250 мл и на 5000 мл и одноразовом мешке Cellbag на 5л. Согласно полученным результатам оказалось, что скорость роста в колбах Thomson примерно в 1,5 раза выше, чем при культивировании в колбах Corning и сопоставима с скоростью роста в одноразовом мешке Cellbag. Очевидно, это связано с особенностями геометрии. Кроме того, было отмечено, что при одинаковой скорости перемешивания конструкция колб Thomson способствует меньшему пенообразованию по сравнению с Corning.

Таким образом, для подготовки инокулята было предложено использовать колбы Thomson, которые являются эффективной альтернативой одноразовых мешков для более выгодной, быстрой и качественной подготовки посевного материала.

На первом этапе масштабирование осуществляли в стеклянных биореакторах с механическим перемешиванием, а также в биореакторе волнового типа с использованием одноразовых мешков. Было показано, что разработанная технология культивирования клеточной линии в малом объеме успешно реализуется и воспроизводится в биореакторах с волновым и орбитальным перемешиванием. Показано, что культивирование клон-продуцента в реакторе волнового типа обеспечивает более благоприятные условия и позволяет достичь максимальные титры и качество продукта.

В результате анализа литературных данных было предложено исследовать влияние изменения температурного режима культивирования в целях увеличения выхода целевого продукта. На этом этапе исследовали поведение культуры клеток в стеклянном биореакторе с механическим перемешиванием, в биореакторе волнового типа и орбитальном биореакторе. В случае клеток, культивировавшихся в биореакторе с механическим перемешиванием и орбитального типов, отмечено небольшое снижение скорости клеточного роста, по сравнению с волновым биореактором. Кроме

того, согласно профилю накопления лактата в случае культивирования в условиях механического перемешивания культура клеток явно подвергалась стрессу, о чем явно свидетельствует его высокая концентрация.

Была показана и подтверждена эффективность снижения температуры культивирования, как одной из стратегий, применяемых для увеличения продуктивности клеточных линий. Культивирование в течение первых двух суток цикла продукции при температуре 37 °С способствовало максимальному наращиванию клеточной биомассы. Последующее снижение температуры до 30 °С позволило максимальным образом использовать ресурсы клеток-продуцентов для наработки целевого рекомбинантного белка. Это позволило повысить эффективность процесса до 1,9 г/л.

На этапе подготовки культуральной жидкости на стадии выделения и очистки продукта осуществляли выбор условий фильтрации в пользу продуктов компании Sartorius, зарекомендовавших себя на рынке, по следующим критериям: скорость потока, общая пропускная способность, потери при фильтрации, химическая совместимость (материал фильтра), размер пор/границы отсечения, число стадий.

На этапе осветления культуральной жидкости, задачей которого является максимальное удаление крупных частиц, таких как клетки и дебриса, было предложено несколько решений в пользу фильтрации: на основе Sartoclear PB1 (11-4 мкм), с использованием последовательного сочетания PB1 и PB 2 (8-1 мкм), и PB1 наряду с достаточно новой разработкой Sartorius PP3 (1.2 мкм). В нашем случае следовало учесть, что благодаря хорошим ростовым характеристикам клеточной линии концентрация клеток в культуральной жидкости за процесс была чрезвычайно высокая. В связи с этим, использование одного фильтра Sartoclear PB1 на стадии предстерилизующей фильтрации затрудняло процесс удаления клеток и дебриса, и, следовательно, требовало использования дополнительных единиц. Однако, сравнивая варианты сочетания PB1 наряду с PB 2 и PP3, удалось повысить эффективность

процесса фильтрации, но с некоторой потерей в объеме КЖ в случае комбинации PB1 и PP3. На втором этапе во всех случаях осуществляли стерилизующую фильтрацию непосредственно с использованием фильтра с широкой химической совместимостью Sartopore 2 XLG (0,8+0,2 мкм) с полиэфирсульфоном и двуслойной мембраной, обеспечивающих высокую пропускную способность и скорость потока в широком диапазоне pH 1-14. Данный подход является современным, эффективным и очень популярным.

Таким образом, было показано, что эффективность отделения клеток и дебриса на стадии предстерилизующей фильтрации зависит от выбранных единиц или их комбинации и существенно влияет на скорость и стоимость этапа подготовки продукта к выделению и очистке. Было показано, последовательное использование Sartoclear PB1 (11-4 мкм) и PB 2 (8-1 мкм) упрощает процедуру и обеспечивает сохранение объема фильтрата до 85% от начального объема.

Таким образом, предложена технология культивирования клеточной линии, продуцирующей мАТ адалимумаб, в биореакторе волнового типа с использованием одноразовых мешков, что соответствует современным требованиям производства биофармацевтических препаратов. Проведены 3 установочные серии культивирования продуцента в мешке объемом 50 л на волновом биореакторе. Результаты проведенных испытаний подтвердили стабильность процесса культивирования как по динамике роста клеточной массы, так и по продуктивности.

В рамках этой работы проведена оценка биоподобия мАТ адалимумаб в сравнении с оригинальным, а именно, характеристика профиля гликозилирования, состава заряженных изоформ, а также анализ биологической активности на проявление способности ингибировать токсичное влияние ФНО-альфа на чувствительной клеточной линии WEN164. Показано, что разработанная технология получения биоаналога моноклонального антитела адалимумаб позволяет осуществлять стабильное промышленное производство надлежащего качества с полноценными

иммунобиологическими свойствами, обеспечивая его безопасное и эффективное применение в объемах, требуемых в роли жизненно необходимого лекарственного средства.

Биоаналог успешно прошел доклинические исследования сравнительной токсичности при многократном подкожном введении с изучением токсикокинетики, иммуногенности и местнораздражающего действия в сравнении с референтным препаратом Хумира (Веттер Фарма, Германия) у яванских макаков, и исследования эффективности на модели артрита на трансгенных мышах Tg197, и рекомендован для проведения клинических исследований.

Расчёт экономических показателей подтвердил рентабельность процесса. Разработанная технология суспензионного культивирования может быть внедрена на производственную площадку ООО «Фармапарк». Выполненные научные исследования и полученные результаты в настоящей работе могут быть учтены и использованы в качестве востребованных решений практических задач на этапах разработки технологий производства современных высокоэффективных лекарственных препаратов.

Полученные в данной работе результаты будут применены в организации высокотехнологичного производства моноклонального антитела адалимумаб на площадке ООО «Фармапарк», относящегося к классу жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств, используемого для лечения аутоиммунных заболеваний, в первую очередь ревматоидного артрита.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

5.1 Выводы

1. Создана клеточная линия CHO-DHFR-ADMB26, стабильно экспрессирующая мАТ адалимумаб, способная расти при высоких плотностях более 40 млн клеток/мл в режиме длительного культивирования с подпиткой. Показаны продуктивность $0,9 \pm 0,1$ г/л в неоптимизированных условиях и стабильный уровень экспрессии при пассировании в течение 2 месяцев. Создан банк клеточной линии и депонирован в НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика».

2. Установлено, что одной из важных характеристик, корректировку которой можно осуществить на этапе разработки технологии культивирования, является профиль гликозилирования, определяющий как эффекторные функции молекулы, так и ее фармакокинетику.

3. Осуществлен подбор условий суспензионного культивирования клона-продуцента мАТ адалимумаб для достижения максимального выхода продукта в режиме цикла культивирования на среде Dynamis (Gibco, США) с добавлением комплексной подпитки Cell Boost 7a/Cell Boost 7b (GE, США). Показано существенные различия в профиле гликозилирования получено мАТ адалимумаб в сравнении с оригинальным по содержанию маннозного гликана Man 5 и галактозилированных форм.

4. Проведена оценка значимости различий в профиле гликозилирования. В сравнительном анализе на связывание мАТ адалимумаб с рецептором FcγRIIIA методом твердофазного ИФА подтверждено, что различия являются значимыми и требуют корректировки. Показано, что использование сахарозы в концентрации 60 мМ является предпочтительным — достигается желаемый эффект по повышению содержания гликоформы Man5 с сохранением культуральных характеристик и продуктивности клеточной линии. Наряду с этим показано, использование сочетания питательных сред для культивирования Dynamis и ActiCHO в

соотношении 12:1 позволяет добиться требуемого профиля гликозилирования в рамках изменчивости оригинального препарата.

5. Осуществлено масштабирование разработанной технологии в биореакторах с разным типом перемешивания. Показано, что технология культивирования клеток СНО в биореакторе волнового типа на основе одноразовых мешков, оптимальная для сохранения ростовых характеристик клона-продуцента, профиля гликозилирования и позволяющая повысить выход целевого белка в 1,5 раза в режиме двухфазного температурного режима, по сравнению с процессами в стеклянном биореакторе с механическим перемешивающим элементом и биореакторе орбитального типа.

6. Проведены 3 установочные серии культивирования продуцента мАТ адалимумаб в мешке объемом 50 л на волновом биореакторе, подтвердившие стабильность и воспроизводимость процесса.

7. Подтверждено биоподобие мАТ Адалимумаб, получаемого по разработанной технологии, в сравнении с оригинальным. Показана аналогичная эффективность биоаналога на проявление биологической активности *in vitro* и *in vivo*. Получены положительные результаты доклинических исследований и рекомендации к проведению клинических испытаний препарата.

8. Расчёт технико-экономических показателей подтвердил, что процесс производства мАТ адалимумаб с использованием разработанной технологии суспензионного культивирования является экономически выгодным: себестоимость культивирования составляет около 5% от рыночной стоимости препарата-оригинатора.

5.2 Практическое использование научных результатов

1. Клеточная линия CHO-DHFR-ADMB26 депонирована в ВКПМ (Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов)
2. Данные, полученные в ходе исследований, включены в опытно-промышленный регламент на производство субстанции мАТ Адалимумаб.
3. Разработана фармакопейная статья предприятия на субстанцию мАТ адалимумаб.
4. Препарат мАТ адалимумаб, созданный с применением разработанной технологии суспензионного культивирования клеток CHO, успешно прошёл доклинические исследования и рекомендован на первую фазу клинических испытаний.

5.3 Рекомендации по использованию научных выводов

1. Препарат, созданный на основе субстанции мАТ адалимумаб, получаемой по разработанной технологии, является высокоэффективным биоаналогом для лечения ревматоидного артрита и других аутоиммунных заболеваний. Полученный биоаналог не уступает по качеству оригинальному, обладая при этом гораздо меньшей стоимостью, и рекомендуется для широкого применения в медицинской практике.

2. Разработанная технология суспензионного культивирования отвечает всем современным требованиям качества, предъявляемым к медицинским препаратам на основе рекомбинантных белков. Данная технология рекомендуется к внедрению в серийное производство биофармацевтических препаратов.

VI. ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов А.А. Терапия моноклональными антителами – панацея или паллиатив? / А.А. Иванов, И.П. Белецкий // НИИ молекулярной медицины ГОУВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова. «Ремедиум». – 2011. – № 3. – С. 37–40.
2. Cheng L. Biosimilars of Monoclonal Antibodies: A Practical Guide to Manufacturing, Preclinical and Clinical Development / Liu Cheng, K. John Morrow. – Inc. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, Canada, 2017. – P. 704.
3. Bhupinder S. S. Biosimilars: an overview / Singh Sekhon Bhupinder, Saluja Vikrant // Dove Medical Press. – 2011. – Vol. 1. – P. 11.
4. Климонтов В.В. Биосимиляры аналогов инсулина: что мы должны о них знать / В.В. Климонтов, Н.Е. Мякина // Эффективная фармакотерапия. – 2015. – №7. – С. 28-34.
5. Broeder A. A single dose, placebo controlled study of the fully human anti-tumor necrosis factor-alpha antibody adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. / A. Broeder, L. Putte, R. Rau, M. Schattenkirchner // Rheumatology. – 2002. – Vol. 29. – P. 2288 -2298.
6. Chew A. Successful treatment of severe psoriasis and psoriatic arthritis with adalimumab. / A. Chew, A. Bennett, C. Smith, J. Barker, B. Kirkham // Dermatology. – 2004. Vol. 151. – P. 492-496.
7. Shaye O. Safety and efficacy of adalimumab in Crohn's disease patients with an attenuated response to infliximab. / O. Shaye, E. Vasiliauskas, A. Ippoliti, M. Dubinsky // Gastroenterology. – 2005. – Vol. 100 (1). – P. 75-79.
8. Jaffe G. Adalimumab in Patients with Active Noninfectious Uveitis / G.J. Jaffe, A.D. Dick, A.P. Brézin, Q.D. Nguyen, J.E. Thorne, P. Kestelyn, T. Barisani-Asenbauer, P. Franco, A. Heiligenhaus, D. Scales, D.S. Chu, A. Camez, N.V. Kwatra, A.P. Song, M. Kron, S. Tari, E.B. Suhler // The New England journal of medicine. – 2016. – Vol. 375 (10). – P. 932-943.
9. Лучихина Е.Л. Первый опыт применения адалимумаба в России: предварительные результаты 24-недельного открытого исследования / Е.Л.

Лучихина, Д.Е. Каратеев, Е.Л. Насонов // Научная практическая ревматология. – 2008. – № 5. – С. 59-63.

10. Nedwin G.E. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization / G.E. Nedwin, S.L. Naylor, A.Y. Sakaguchi, D. Smith, J. Jarrett-Nedwin, D. Pennica, D.V. Goeddel, P.W. Gray // Nucleic Acids Research. – 1985. Vol. –13 (17). – P. 6361–6373.

11. Kalliolias G.D. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies / G.D. Kalliolias, L.B. Ivashkiv // Nature reviews. Rheumatology. – 2016. – Vol. 12(1). – P. 49–62.

12. Aggarwal B.B. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey / B.B. Aggarwal, S.C. Gupta, J.H. Kim // Blood. – 2012. – Vol. 119. – P. 651–665.

13. Locksley R.M. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology / R.M. Locksley, N. Killeen, M.J. Lenardo // Cell. – 2001. – Vol. 104 (4). – P. 487–501.

14. Carswell E.A. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors / E.A. Carswell, L.J. Old, R.L. Kassel, S. Green, N. Fiore, B. Williamson // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1975. Vol. 72 (9). – P. 3666–3670.

15. Pathol J. TNF-mediated inflammatory disease. The Journal of pathology. – 2008. – Vol. 214(2). – P. 149-60.

16. Feldmann M. Translating molecular insights in autoimmunity into effective therapy. Annual review of immunology. – 2009. – Vol. 27. – P. 1–27.

17. Cerami A. The value of failure: the discovery of TNF and its natural inhibitor erythropoietin. Journal of internal medicine. – 2011. Vol. 269. – P. 8–15.

18. Monaco C. Anti-TNF therapy: past, present and future / C. Monaco, J. Nanchahal, P. Taylor, M. Feldmann // International immunology. – 2015. Vol. – 27. –P. 55–62.

19. Dorner T. Biosimilars in rheumatology: current perspectives and lessons learnt. / Dorner, T.; Kay, J. // *Nature reviews. Rheumatology*. – 2015. Vol. 11 (12). – P. 713-724.

20. Karampetsou M.P. TNF- α antagonists beyond approved indications: stories of success and prospects for the future / M.P. Karampetsou, S.N. Liossis, P.P. Sfikakis // *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*. – 2010. Vol. 103. – P. 917–928.

21. Probert L. Neuroscience. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*. – 2015. – Vol. 302. – P. 2-22

22. Horiuchi K. Cutting edge: TNF- α -converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. / K. Horiuchi., T. Kimura, T. Miyamoto, H. Takaishi, Y. Okada, Y. Toyama, C.P. Blobel. // *Immunology*. – 2007. – Vol. 179. – P. 2686–2689.

23. Locksley R.M. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology / R.M. Locksley, N. Killeen, M.J. Lenardo // *Cell*. – 2001. – Vol. 104. – P. 487–501.

24. Grell M. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor / M. Grell, E. Douni, H. Wajant, M. Löhden, M. Clauss, B. Maxeiner, S. Georgopoulos, W. Lesslauer, G. Kollias, K. Pfizenmaier, P. Scheurich // *Cell*. – 1995. – Vol. 83. – P. 793–802.

25. Pasparakis M. Necroptosis and its role in inflammation / M. Pasparakis, P. Vandenabeele // *Nature*. – 2015. – Vol. 517. – P.311–320.

26. Hsu H. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation / H. Hsu, J. Xiong, D.V. Goeddel // *Cell*. – 1995. – V. 81. – № 4. – P. 495-504.

27. Bazzoni F. The tumor necrosis factor ligand and receptor families / F. Bazzoni, B. Beutler // *N Engl J Med*. – 1996. – V. 334. – № 26. – P. 1717-1725.

28. Morgan M.J. Reactive oxygen species in TNF-alpha-induced signaling and cell death / M.J. Morgan, Z.G. Liu // *Mol Cells*. – 2010. – V. 30. – № 1. – P. 1-12.

29. Aggarwal B.B. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell*. – 2004. – V. 6. – № 3. – P. 203-208.
30. Aggarwal B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a doubleedged sword. *Nature reviews Immunology*. – 2003. – V. 3 – № 9. – P. 745-756.
31. Natoli G. Tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 signaling downstream of TNF receptor-associated factor 2. Nuclear factor kappaB (NFkappaB)-inducing kinase requirement for activation of activating protein 1 and NFkappaB but not of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase / G. Natoli, A. Costanzo, F. Moretti // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – № 42. – P. 26079-26082.
32. Ermolaeva M.A. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIFdependent inflammatory responses / Ermolaeva M.A., Michallet M.C., Papadopoulou N. et al. // *Nature reviews Immunology*. – 2008. – V. 9. – № 9. – P. 1037-1046.
33. Brenner D. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die / D. Brenner, H. Blaser, T.W. Mak // *Nature reviews. Immunology*. – 2015. – Vol. 15. – P. 362–374.
34. Барановский А.Ю. Роль фактора некроза опухоли альфа в развитии аутоиммунной патологии печени: нерешенная проблема / А.Ю. Барановский, Н.В. Марченко, У.А. Мительглик, К.Л. Райхельсон // *Гастроэнтерология. Практическая медицина*. – 2014. – №1 (77). – С. 15-19.
35. Фурсенко Д.В. Поведенческое фенотипирование мышей с нокаутом по фактору некроза опухоли. / Д.В. Фурсенко, Н.В. Хоцкин, В.А. Куликов, А.В. Куликов // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2015. – № 19(4). – С. 394-398.
36. Tracey D. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review / D. Tracey, L. Klareskog, E.H. Sasso, J.G. Salfeld, P.P. Tak // *Pharmacology & therapeutics*. – 2007. – Vol. 117. P. 244–279.
37. Насонов Е.Л. Фармакотерапия ревматоидного артрита – взгляд в 21 век. *Клиническая медицина*. – 2005. – № 6. – С. 8-12.
38. Rheumatoid arthritis <https://parsseh.com/9381/rheumatoid-arthritis.html>

39. Насонов Е.Л. Применение инфликсимаба (моноклональные антитела к фактору некроза опухоли) в ревматологии: новые данные. РМЖ. – 2004. – № 20. – С. 1123-1127.

40. Насонов Е.Л. Перспективы применения полностью человеческих моноклональных антител к фактору некроза опухоли (Adalimumab – Humira) при ревматоидном артрите. Клин Фармакол. Фармакотерапия. – 2007. – № 1. – С. 71-74.

41. Васюк Ю.А. «Цитокиновая» модель патогенеза хронической сердечной недостаточности и возможности нового терапевтического подхода в лечении декомпенсированных больных / Васюк Ю.А., Дударенко О.П., Ющук Е.Н., Школьник Е.Л., Серова М.К. // Рациональная фармакотерапия в Кардиологии. – 2006. – №4. – С. 63-70.

42. Насонов Е.Л. Новые аспекты патогенеза сердечной недостаточности: роль фактора некроза опухоли / Насонов Е.Л., Самсонов М.Ю. // Сердечная недостаточность. – 2000. – Том 1. – № 4. – С. 139-143.

43. Goldhaber J.L. Effects of TNF-alpha on [Ca²⁺] and contractility in isolated adults rabbit ventricular myocytes / J.L. Goldhaber, K.H. Kim, P.D. Natterson, T. Lawrence, P Yang., J.N. Weiss // The American journal of physiology. – 1996. – Vol. 271. – P. 1449-1455.

44. Gulick T. Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness / T Gulick, MK Chung, SJ Pieper, LG Lange, GF. Schreiner // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1989. – Vol. 86. – P. 6753-6757.

45. Yokoyama T. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-α in the adult mammalian heart. / T. Yokoyama, L. Vaca, R.D. Rossen, W. Durante, P. Hazarika, D.L. Mann // The Journal of clinical investigation. – 1993. – Vol. 92. – P. 2303-2313.

46. Yokoyama T. Tumor necrosis factor-α provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. / T. Yokoyama, M. Nakano, J.L. Bednarczyk,

B.W. McIntyre, M. Entman, D.L. Mann. // *Circulation*. – 1997. – Vol. 95: – P. 1247-1252.

47. Bozkurt B. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor- α promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats / B. Bozkurt, S.B. Kribbs, F.J. Jr. Clubb, L.H. Michael, V.V. Didenko, P.J. Hornsby, Y. Seta, H. Oral, F.G. Spinale, D.L. Mann // *Circulation*. – 1998. – Vol. 97. – P. 1382-1391.

48. Verjee L.S. Unraveling the signaling pathways promoting fibrosis in Dupuytren's disease reveals TNF as a therapeutic target / L.S. Verjee, J.S. Verhoekx, J.K. Chan, T. Krausgruber, V. Nicolaidou, D. Izadi, D. Davidson, M. Feldmann, K.S. Midwood, J. Nanchahal // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – Vol. 110. P. E928–E937.

49. Montgomery S.L. Tumor necrosis factor- α and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system / S.L. Montgomery, W.J. Bowers // *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. – 2012. Vol. 7(1). – P. 42-59.

50. Каде А.Х. Физиологические функции сосудистого эндотелия / А.Х. Каде, С.А. Занин, Е.А. Губарева, А.Ю. Туровая, Ю.А. Богданова, С.О. Апсалимова, С.Н. Мерзлякова // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – № 11. – С. 611-617.

51. Масычева В. И. Некоторые аспекты клинических испытаний препаратов фактора некроза опухоли / В. И. Масычева, А. О. Белкина, Е. Д. Даниленко Сысоева Г. М. // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2010. – № 4. – Т. 9. С. 39-44.

52. Hunt L. The 'therapeutic window' and treating to target in rheumatoid arthritis / L. Hunt, M. Buch // *Clinical medicine: journal of the Royal College of Physicians of London*. – 2013. – V. 13(4). – P. 387-390

53. Насонов Е.Л. Фармакотерапия ревматоидного артрита в 21 веке: фокус на ритуксимаб. Современная ревматология. – 2009. – № 4. – С. 67-75.

54. Which TNF inhibitor for rheumatoid arthritis? / The Medical letter on drugs and therapeutics. – 2010. – V. 52(1338). – P. 38-39.

55. Choy E.H. The problem of choice: current biologic agents and future prospects in RA / E.H. Choy, A.F. Kavanaugh, S.A. Jones // Nature reviews. Rheumatology. – 2013. – V. 9 (3). – P. 154-163.

56. Malottki K. Adalimumab, etanercept, infliximab, rituximab and abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis after the failure of a tumour necrosis factor inhibitor: a systematic review and economic evaluation / K. Malottki, P. Barton, A. Tsourapas, A.O. Uthman, Z. Liu, K. Routh, M. Connock, P. Jobanputra, D. Moore, A. Fry-Smith, Y.F. Chen // Health technology assessment. – 2011. – V. 15(14). – P. 1-278.

57. Cohen S. Biosimilars: implications for rheumatoid arthritis therapy / S. Cohen, J. Kay // Current opinion in rheumatology. – 2017. V. – 29(3). – P. 260-268.

58. Насонов Е.Л. Инновационные технологии в лечении аутоиммунных ревматических заболеваний человека. Ревматология. Нефрология. Травматология, Ревматология. – 2008. – №1 (25). – С. 3-4.

59. Князев О. В. Инфликсимаб в терапии воспалительных заболеваний кишечника / О. В. Князев, Л. Б. Лазебник, И. Н. Ручкина, Т. М. Царегородцева, А. И. Парфенов // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2009. – №5. – С. 64-68.

60. Liu W. Efficacy and safety of TNF- α inhibitors for active ankylosing spondylitis patients: Multiple treatment comparisons in a network meta-analysis / W. Liu, Y.H. Wu, L. Zhang, X.Y. Liu, Bin Xue, Bin Liu, Y. Wang // Scientific reports. – 2016. – V. 6. – P. 1-8.

61. Baraliakos X. Long-term efficiency of infliximab in patients with ankylosing spondylitis: real life data confirm the potential for dose reduction / X. Baraliakos, F. Heldmann F., van den Bosch, G. Burmester, H. Gaston, IE. van der Horst-Bruinsma, A. Krause, R. Schmidt, M. Schneider, J. Sieper, B. Andermann, A. van

Tubergen, M. Witt, J. Braun // Rheumatic & musculoskeletal diseases open. – 2016. – V. 2(2). – P. 1-3.

62. Vinicki J.P. Sustained remission after long-term biological therapy in patients with large vessel vasculitis: an analysis of ten cases / J.P. Vinicki, R. García-Vicuña, M. Arredondo, J.P. López-Bote, J.A. García-Vadillo, S. Castañeda, J.M. Álvaro-Gracia // Reumatología clínica. – 2016. – V.944. – P. 1-4.

63. Katsicas M.M. Biologic agents in juvenile spondyloarthropathies / M.M. Katsicas, R. Russo // Pediatric rheumatology online journal. – 2016. – V. 14:17. – P. 1-8.

64. Mudduluru B.M. TNF-alpha antagonist induced lupus on three different agents. / Mudduluru B.M., Shah S., Shamah S., Swaminath A. // Postgraduate medicine. – 2017. – V. 129(2). – P. 304-306.

65. Riolo G. Anti-tumor necrosis factor inhibitor therapy-induced dermatomyositis and fasciitis / G. Riolo, T.E. Towheed // The Journal of rheumatology. – 2012. – V. 39(1). P. 192-194.

66. Gordon P.A. Immunosuppressant and immunomodulatory treatment for dermatomyositis and polymyositis / P.A. Gordon, J.B. Winer, J.E. Hoogendijk, E.H. Choy // The Cochrane database of systematic reviews. – 2012. – V. 15 (8).

67. Özer İ. Two diseases one remedy? Systemic amyloidosis secondary to hidradenitis suppurativa: Treatment with infliximab / İ. Özer, C. Karaçin, E. Adışen, G. Güz, M. Ali Gürer // Dermatologic therapy. – 2016. – V. 30 (2).

68. Насонов Е.Л. Эффективность и безопасность ингибиторов фактора некроза опухоли-а при ревматоидном артрите. Русский медицинский журнал. – 2008. – № 25. С. 53-57.

69. Каратеев Д.Е. Этанерцепт при ревматоидном артрите Научно-практическая ревматология. – 2009. – №5. – С. 53-57.

70. Каратеев Д.Е. Современные принципы лечения ревматоидного артрита: акцент на раннюю агрессивную терапию / Д.Е. Каратеев, Е.Л. Лучихина // Эффективная Фармакотерапия (Ревматология). – 2011. – №1. – С. 12-17.

71. Никишина И.П. Растворимые рецепторы к фактору некроза опухоли (этанерцепт) в терапии ювенильного артрита. Русский медицинский журнал. – 2009. – Т. 17. – №4. – С. 177.

72. Никишина И.П. Этанерцепт в лечении ювенильного артрита: от опыта клинических исследований к клинической практике. Русский медицинский журнал. – 2010. – Т. 18. – №27. – С. 1686.

73. Ягудина Р.И. Фармакоэкономический анализ применения генно-инженерных биологических препаратов при ювенильном ревматоидном артрите / Р.И. Ягудина, И.Ю. Зинчук, А.Ю. Куликов // Фармакоэкономика. – 2011. – Т. 4. – №1. С. 18-23.

74. Алексеева Е.И. Перспективы применения растворимых рецепторов к ФНО-альфа в терапии ювенильных артритов / Е.И. Алексеева, С.И. Валиева, Р.В. Денисова, Т.М. Бзарова // Вопросы современной педиатрии. – 2008. – Т. 7. – № 5. – С. 51-56.

75. Алексеева Е.И. Ювенильный идиопатический артрит: клиническая картина, диагностика, лечение. Вопросы современной педиатрии. – 2015. – № 14 (1). – С. 78–94.

76. Furst D.E. Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatic diseases / D.E. Furst, E.C. Keystone, A.K. So, J. Braun, F.C. Breedveld, G.R. Burmester, F. De Benedetti, T. Dörner, P. Emery, R. Fleischmann, A. Gibofsky, J.R. Kalden, A. Kavanaugh, B. Kirkham, P. Mease, A. Rubbert-Roth, J. Sieper, N.G. Singer, J.S. Smolen, P.L. Van Riel, M.H. Weisman, K.L. Winthrop // Annals of the rheumatic diseases. – 2007. – V. 72 (2). – P. 34.

77. Митенко Е.В. Опыт применения адалимумаба у больного ювенильным анкилозирующим спондилитом и увеитом / Е.В. Митенко, Е.И. Алексеева, Т.М. Бзарова, С.И. Валиева, А.М. Чомахидзе, К.Б. Исаева, Е.Г. Чистякова, Р.В. Денисова, Т.В. Слепцова, Т.Ю. Поляева, А.Н. Фетисова // Педиатрическая фармакология. – 2012. – Т. 9. – № 1. – С. 118-122.

78. Лучихина Е.Л. Первый опыт применения адалимумаба в России: предварительные результаты 24-недельного открытого исследования / Л.

Лучихина, Д.Е. Каратеев, Е.Л. Насонов // Научно практическая ревматология. – 2008. – № 5. – С. 59-60.

79. Murdaca G. Immunogenicity of infliximab and adalimumab: what is its role in hypersensitivity and modulation of therapeutic efficacy and safety? / G. Murdaca, F. Spanò, M. Contatore, A. Guastalla, E. Penza, O. Magnani, F. Puppo // Expert opinion on drug safety. – 2016. – V. 15(1). P. 43-52.

80. Reichert J.M. Antibodies to watch in 2015. Monoclonal antibodies. – 2015. – V. 7(1). – P. 1-8.

81. Hu S. Comparison of the Inhibition Mechanisms of Adalimumab and Infliximab in Treating Tumor Necrosis Factor α -Associated Diseases from a Molecular View / S. Hu, S. Liang, H. Guo, D. Zhang, H. Li, X. Wang, W. Yang, W. Qian, S. Hou, H. Wang, Y. Guo, Z. Lou // The Journal of biological chemistry. – 2013. – V. 288(38). – P. 27059-27067.

82. Liang S. Structural Basis for Treating Tumor Necrosis Factor α -associated Diseases with the Therapeutic Antibody Infliximab / Liang S., Dai J, Hou S, Su L, Zhang D, Guo H, Hu S, Wang H, Rao Z, Guo Y, Lou Z. // The Journal of biological chemistry. – 2013. – V. 288(19). – P. 13799–13807.

83. Насонов Е.Л. Адалимумаб при ревматоидном артрите: 2011. Научно-практическая ревматология. – 2012. – №51. – С. 2-19.

84. Бзарова Т.М. Безопасность применения ингибиторов фактора некроза опухоли во взрослой и детской ревматологической практике / Т.М. Бзарова, Е.И. Алексеева, С.И. Валиева, А.М. Алексеева, Р.В. Денисова, К.Б. Исаева, Е.Г. Чистякова, А.О. Лисицын // Вопросы современной педиатрии. – 2010. Т. 9. – № 1. – С. 82-94.

85. Лукина Г.В. Цертолизумаб пегол в терапии ревматоидного артрита / Г.В. Лукина, Я.А.Сигидин // Современная ревматология. – 2012. – №2. С. 44-49.

86. Fossati G. Certolizumab pegol has a different profile from the other anti-TNFs, including golimumab, in a variety of in vitro assays / G. Fossati, A. Nesbitt // Journal of Translational Medicine. – 2010. – V. 69 (Suppl. 3). – P. 37.

87. Sandborn W.J. Long-term safety and efficacy of certolizumab pegol in the treatment of Crohn's disease: 7-year results from the PRECiSE 3 study / Sandborn W.J., Lee S.D., Randall C., Gutierrez A., Schwartz D.A., Ambarkhane S., Kayhan C., Pierre-Louis B., Schreiber S., Lichtenstein G.R. // *Alimentary pharmacology and therapeutics*. – 2014. – V. 40(8). – P. 903-916.

88. Насонов Е.Л. Новые аспекты фармакотерапии ревматоидного артрита: фокус на цертолизумаб пегол / Е.Л. Насонов, В.Н. Амирджанова // *Научно-практическая ревматология*. – 2011. – №1. – С. 40–49.

89. Fleischmann R. Efficacy and safety of certolizumab pegol monotherapy every 4 weeks in patients with rheumatoid arthritis failing previous disease-modifying antirheumatic therapy: the FAST4WARD study / R. Fleischmann, J. Vencovsky, R.F. van Vollenhoven, D. Borenstein, J. Box, G. Coteur, N. Goel, H.P. Brezinschek, A. Innes, V. Strand // *Annals of the rheumatic diseases*. – 2009. – V. 68. – P. 805–811.

90. Денисова Р.В. Новый блокатор ФНО-альфа – голимумаб. Обзор результатов исследований по оценке эффективности и безопасности / Р.В. Денисова, Е.И. Алексеева // *Вопросы современной педиатрии*. – 2012. – Т. 11. – № 4. – С.14-20.

91. Frampton J.E. Golimumab: A Review in Inflammatory Arthritis. *BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. – 2017. – V. 31(3). – P. 263-274.

92. Zhou H. Pharmacokinetics and safety of golimumab, a fully human anti-TNF-alpha monoclonal antibody, in subjects with rheumatoid arthritis. / H. Zhou, H. Jang, R.M. Fleischmann, E. Bouman-Thio, Z. Xu, J.C. Marini, C. Pendley, Q. Jiao, G. Shankar, S.J. Marciniak, S.B. Cohen, M.U. Rahman, D. Bake, M.A. Mascelli, H.M. Davis, D.E. Everitt // *Journal of clinical pharmacology*. – 2007. – V. 47. –P. 383–396.

93. Насонов Е.Л. Новые аспекты фармакотерапии ревматоидного артрита: фокус на цертолизумаба пэгол / Е.Л. Насонов, В.Н. Амирджанова // *Научно-практическая ревматология*. – 2011. – № 1. – С. 40-49.

94. Бектур К.Р. Сравнение препаратов ингибиторов фактора некроза опухолей в лечении ревматоидного артрита по фармакоэкономическим параметрам в системе здравоохранения республики Казахстан / К.Р. Бектур, А.Е. Гуляев, З.Т. Шульгау, Б.А. Ермакбаева, Г.Т. Абуова, Т.С. Нургожин // MEDICINE. – 2014. – №7. – С. 97-102.

95. Zhou H. Efficacy, safety and pharmacokinetics of biosimilars of anti-tumor necrosis factor- α agents in rheumatic diseases / H. Zhou, H. Jang, R.M. Fleischmann, E. Bouman-Thio, Z. Xu, J.C. Marini, C. Pendley, Q. Jiao, G. Shankar, S.J. Marciniak, S.B. Cohen, M.U. Rahman, D. Baker, M.A. Mascelli, H.M. Davis, D.E. Everitt // Journal of autoimmunity. – 2017. – V. 79. – P. 4-16.

96. Jacobs I. Biosimilars for the Treatment of Chronic Inflammatory Diseases: A Systematic Review of Published Evidence / Jacobs I., Petersel D., Isakov L., Lula S., Lea Sewell K. // BioDrugs:clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy. – 2016. V. – 30(6). P. 525-570.

97. Gecse K.B. Biosimilar Monoclonal Antibodies for Inflammatory Bowel Disease: Current Comfort and Future Prospects / K.B. Gecse, P.L. Lakatos // Drugs. – 2016. – V. 76(15). P. 1413-1420.

98. Heinzelmann E. Off they go: Single-use Technology in Future Production BioTech 2016 Conference at ZHAW Waedenswil. Chimia (Aarau). – 2016. – V. 70(10). P. 740-743.

99. Eibl R. Системы одноразового применения в производстве биопрепаратов: Quo Vadis? / R. Eibl, D. Eibl // Фармацевтическая отрасль. – 2015. – №4 (51). – С. 80-85.

100. Jacquemart R. A Single-use Strategy to Enable Manufacturing of Affordable Biologics / R. Jacquemart, M. Vandersluis, M. Zhao, K. Sukhija, N. Sidhu, J. Stout // Computational and structural biotechnology journal. – 2016. – V.14. – P. 309-318.

101. Shevitz J. An economic comparison of three cell culture techniques: fed-batch, concentrated fed-batch, and concentrated perfusion / Shevitz J., Lim J., Sinclair A., Carter J.B. // BioPharm International. – 2011. – V. 24 (2). – P. 30-36.

102. Rose S. Mammalian cell culture: process development considerations. Handbook of industrial cell culture / Rose S., Black T., Ramakrishnan D. // Humana Press; Totowa. – 2003. – P. 546.
103. Bonham-Carter J. A brief history of perfusion / Bonham-Carter J., Shevitz J.// Bioprocess International. – 2011. – V. 9(9). – P. 24–35.
104. Warikoo V. Intergrated continuous production of recombinant therapeutic proteins / V. Warikoo, R. Godawat, K. Brower, S. Jain, D. Cummings, E. Simons, T. Johnson, J. Walther, M. Yu, B. Wright, J. McLarty, K.P. Karey, C. Hwang, W. Zhou, F. Riske, v K. Konstantino// Biotechnology and bioengineering. – 2012. –V. 109 (12). – P. 3018–3029.
105. Levine H.L. Efficient, flexible facilities for the 21st century / H.L. Levine, J.E. Lilja, R. Stock, H. Hummel, S.D. Jones // Bioprocess International. – 2012. –V. 10(11). – P. 2-9.
106. Langer E.S. Continuous bioprocessing and perfusion: wider adoption coming as bioprocessing matures / Langer E.S., Rader R.A. // Bioprocessing Journal. – 2014. – P. 50-55.
107. Pralong A. Paradigm shift for vaccine manufacturing facilities: the next generation of flexible, modular facilities / A. Pralong, H.L. Levine, J. Lilja, A. Gaasvik, H. Hummel // Engineering In Life Sciences. – 2014. – V. 14(3). – P. 244–253.
108. Gadamasetti K. Process chemistry in the pharmaceutical industry / K. Gadamasetti, T. Braish // CRC Press. – 2007. – V. 2. – P. 427–453.
109. Jungbauer A. Continuous downstream processing of biopharmaceuticals. Trends in Biotechnology. – 2013. – V. 31(8). – P. 479-492.
110. Muhl M., Sievers D. Cell harvesting of biotechnological process by depth filtration / Muhl M., Sievers D. // Bioprocess International. – 2010. – P. 86–88.
111. Schreffler J. Characterization of Postcapture impurity removal across an adsorptive depth filter / J. Schreffler, M. Bailley, T. Klimek, P. Agneta, W.E. Wiltsie, M. Felo // Bioprocess International. – 2015. – V.13(3). – P. 36–45.

112. Lagrange B. High-cell-density clarification by single-use diatomaceous earth filtration / B. Minow, F. Egner, F. Jonas, B. Lagrange // *Bioprocess International*. – 2014. – V. 12(4). – P. 2-9.
113. Konstantinov K.B. The future of industrial bioprocessing: Batch or continuous. White paper on continuous bioprocessing / Konstantinov K.B., Cooney C.L. // *Journal Pharmaceutical Sciences*. – 2015. – V.104. – P. 813–820.
114. Hernandez R. Continuous manufacturing: a changing processing paradigm. *BioPharm International*. – 2015. – 28(4). – P. 35-49.
115. Rathore A.S. Quality by design for biopharmaceuticals: principles and case studies / A.S. Rathore, R. Mhatre // *Wiley*. – 2009. – P. 328.
116. Tingfeng L. Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies for Recombinant Protein Production / L. Tingfeng, Y. Yuansheng, Ng. Say Kong // *Pharmaceuticals*. – 2013. – V. 6. – P. 579-603.
117. Zhiqiang An. Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic. *Wiley & Sons, Inc.* – 2009. – P. 912.
118. Birch J. R. Antibody production / Birch J. R., Racher A. J. // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2006. – V. 58 – P. 671– 685.
119. Li F. Cell culture processes for monoclonal antibody production mAbs / F. Li, N. Vijayasankaran, A.Y. Shen, R. Kiss, A. Amanullah // *Monoclonal antibodies*. – 2010. – V. 2(5). – P. 466-477.
120. Fischer S. The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives / S. Fischer, R. Handrick, K. Otte // *Biotechnology Advances*. – 2015. – V. 33(8). – P.1878-1896.
121. Urlaub G. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity / G. Urlaub, L.A. Chasin // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1980. – V. 77. – P. 4216–4220.
122. Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells / Urlaub G., Kas E., Carothers A.M., Chasin, L.A., // *Cell*. – 1983. – V. 33(2.). – P. 405-412.

123. Wurm F.M. First CHO genome / F.M. Wurm, D. Hacker // *Nature biotechnology*. – 2011. – V. 29. – P. 718–720.
124. Cockett M.I. High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese hamster ovary cells using glutamine synthetase gene amplification / M.I. Cockett, C.R. Bebbington, Yarranton G.T. // *BioTechnology*. – 1990. – V. 8(7). – P. 662–667.
125. Sanders P.G. Gene amplification: the Chinese hamster glutamine synthetase gene / P.G. Sanders, A. Hussein, Coggins, L., R. Wilson // *Developments in biological standardization*. – 1987. – V. 66. – P. 55–63.
126. Cacciatore J.J. Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system / J.J. Cacciatore, L.A. Chasin, E.F. Leonard // *Biotechnology Advances*. – 2010. – V. 28 (6). – P. 673–681.
127. Chusainow J. Study of Monoclonal Antibody-Producing CHO Cell Lines: What Makes a Stable High Producer? / J. Chusainow, Y. S. Yang, J.H. Yeo, P.C. Toh, P. Asvadi, N.S. Wong, M.G. Yap // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2009. – V. 102(4). – P. 1182–1196.
128. Wurm F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature biotechnology*. – 2004. – V. 22 (11). – P. 1393–1398.
129. Jun S.C. Selection strategies for the establishment of recombinant Chinese hamster ovary cell line with dihydrofolate reductase-mediated gene amplification / S.C. Jun, M.S. Kim, J.Y. Baik, S.O. Hwang, G.M. Lee // *Applied genetic and molecular biotechnology*. – 2005. – V. 69 (2). – P. 162–169.
130. Lee J.S. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering of CHO cell factories: application and perspectives / J.S. Lee, L.M. Grav, N.E. Lewis, H. Fastrup // *Biotechnology journal*. – 2015. – 10(7). – P. 979–994.
131. Boshart, M. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus / M. Boshart, F. Weber, G. Jahn,

K. Dorsch-Häsler, B. Fleckenstein, W. Schaffner // *Cell*. – 1985. – V. 41. – N. 2. – P. 521–530.

132. Chatellard P. The IE2 promoter/enhancer region from mouse CMV provides high levels of therapeutic protein expression in mammalian cells / P. Chatellard, R. Pankiewicz, E. Meier, L. Durrer, C. Sauvage, M.O. Imhof // *Biotechnology and bioengineering*. – 2007. – V. 96. – N. 1. – P. 106–117.

133. Cardin R.D. Murine cytomegalovirus IE2, an activator of gene expression, is dispensable for growth and latency in mice / R.D. Cardin, G.B. Abenes, C.A. Stoddart, E.S. Mocarski // *Virology*. – 1995. – V. 209. – N. 1. – P. 236–241.

134. Kim S.Y. The human elongation factor 1 alpha (EF-1 alpha) first intron highly enhances expression of foreign genes from the murine cytomegalovirus promoter / S.Y. Kim, J.H. Lee, H.S. Shin, H.J. Kang, Y.S. Kim // *Journal of biotechnology*. – 2002. – V. 93. – №. 2. – P. 183–187.

135. Running Deer J. High-level expression of proteins in mammalian cells using transcription regulatory sequences from the Chinese hamster EF-1alpha gene / J. Running Deer and D.S. Allison // *Biotechnology progress*. – 2004. – Vol. 20. – №. 3. – P. 880-889.

136. Kim J.M. Improved recombinant gene expression in CHO cells using matrix attachment regions / J.M. Kim, J.S. Kim, D.H. Park, H.S. Kang, J. Yoon, K. Baek, Y. Yoon // *Journal of biotechnology*. – 2004. – V. 107. – P. 95–105.

137. Girod P.A. Use of the chicken lysozyme 5' matrix attachment region to generate high producer CHO cell lines / P.A. Girod, M. Zahn-Zabal, N. Mermod // *Biotechnology and bioengineering*. – 2005. – V. 91. – P. 1–11.

138. Harraghy N. Sustained transgene expression using MAR elements / N. Harraghy, A. Gaussin, N. Mermod // *Current gene therapy*. – 2008. – V. 8. – P. 353–366.

139. Recillas-Targa F. Prospects and implications of using chromatin insulators in gene therapy and transgenesis / F. Recillas-Targa, V. Valadez-

Graham, C.M. Farrell // *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. – 2004. – V. 26. – P. 796–807.

140. Kwaks T.H. Employing epigenetics to augment the expression of therapeutic proteins in mammalian cells / T.H. Kwaks, A.P. Otte // *Trends in biotechnology*. – 2006. – V. 24. – P. 137–142.

141. Maksimenko O.G. Use of transgenic animals in biotechnology: prospects and problems / O.G. Maksimenko, A.V. Deykin, Y.M. Khodarovich, P.G. Georgiev // *Acta Naturae*. – 2013. – V.5(1). – P. 33-46.

142. Palazzoli F. Landscape of chromatin control element patents: positioning effects in pharmaceutical bioproduction / F. Palazzoli, S. Bire, Y. Bigot, F. Bonnin-Rouleux // *Nature biotechnology*. – 2011. – V. 29. – P. 593-597.

143. Antoniou M. Transgenes encompassing dual-promoter CpG islands from the human TBP and HNRPA2B1 loci are resistant to heterochromatin-mediated silencing / M. Antoniou, L. Harland, T. Mustoe, S. Williams, J. Holdstock, E. Yague, T. Mulcahy, M. Griffiths, S. Edwards, P.A. Ioannou, A. Mountain, R. Crombie // *Genomics*. – 2003. – V. 82(3). – P. 269-279.

144. Nematpour F. Evaluating the expression profile and stability of different UCOE containing vector combinations in mAb-producing CHO cells / F. Nematpour, F. Mahboudi, B. Vaziri, V. Khalaj, S. Ahmadi, M. Ahmadi, S. Ebadat, Davami F. // *BioMed Central biotechnology*. – 2017. – V. 17(1). – P. 18.

145. Kwaks T.H. Identification of anti-repressor elements that confer high and stable protein production in mammalian cells / T.H. Kwaks, P. Barnett, W. Hemrika, T. Siersma, R.G. Sewalt, D.P. Satiijn, J.F. Brons, R. van Blokland, P. Kwakman, A.L. Kruckeberg, A. Kelder, A.P. Otte // *Nature biotechnology*. – 2003. – V. 21. – P. 553-558.

146. Ho S.C. IRES-mediated Tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing CHO cell lines / S.C. Ho, M. Bardor, H. Feng, Mariati, Y.W. Tong, Z. Song, M.G. Yap, Y. Yang // *Journal of Biotechnology*. – 2012. – V. 157(1). – P. 130-139.

147. Ho S.C. Comparison of Internal Ribosome Entry Site (IRES) and Furin-2A (F2A) for Monoclonal Antibody Expression Level and Quality in CHO Cells / S.C. Ho, M. Bardor, B. Li, J.J. Lee, Z. Song, Y.W. Tong, L.T. Goh, Y. Yang // PLoS One. – 2013. – V. 8(5).
148. Birch J.R. Antibody production / Birch J.R., Racher A.J. // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2006. – V. 58(5-6). – P. 671-685.
149. Rita Costa A. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production / A. Rita Costa, M. Elisa Rodrigues, M. Henriques, J. Azeredo, R. Oliveira // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2010. – V. 74. – P. 127-138.
150. Barnes L.M. Molecular analysis of successful cell line selection in transfected GS-NS0 myeloma cells / L.M. Barnes, C.M. Bentley, N. Moy, A.J. Dickson // Biotechnology and Bioengineering. – 2007. – V. 96(2). – P. 337–348.
151. Ng S.K. Vector fragmentation: characterizing vector integrity in transfected clones by Southern blotting / S.K. Ng, W. Lin, R. Sachdeva, D.I. Wang, M.G. Yap // Biotechnology Progress. – 2010. – V. 26(1). – P. 11-20.
152. Yang, Y.S. Mutated polyadenylation signals for controlling expression levels of multiple genes in mammalian cells. / Y. Yang, Mariati, S.C. Ho, M.G. Yap // Biotechnology and Bioengineering. – 2009. – V. 102. – P. 1152–1160.
153. Fussenegger M. Genetic optimization of recombinant glycoprotein production by mammalian cells / M. Fussenegger, J.E. Bailey, H. Hauser, P.P. Mueller // Trends in Biotechnology. – 1999. – V. 17(1). – P. 35–42.
154. Tang D. Supplementation of Nucleosides During Selection Can Reduce Sequence Variant Levels in CHO Cells Using GS/MSX Selection System / Tang D., Lam C., Louie S., Hoi K.H., Shaw D., Yim M., Snedecor B., Misaghi S. // Biotechnol J. – 2017.
155. Eszterhas S.K. Transcriptional interference by independently regulated genes occurs in any relative arrangement of the genes and is influenced by chromosomal integration position / S.K. Eszterhas, E.E. Bouhassira, D.I.

Martin, S. Fiering // *Molecular and Cellular Biology*. – 2002. – V. 22(2). – P. 469-479.

156. Lee C.J. A clone screening method using mRNA levels to determine specific productivity and product quality for monoclonal antibodies / C.J. Lee, G. Seth, J. Tsukuda, R.W. Hamilton // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2009. – V. 102(4). – P. 1107–1118.

157. Abu-Absi S. Cell Culture Process Operations for Recombinant Protein Production / S. Abu-Absi, S. Xu, H. Graham, N. Dalal, M. Boyer, K. Dave // *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. – 2014. – V. 139. – P. 35–68.

158. Janakiraman V. Application of high-throughput mini-bioreactor system for systematic scale-down modeling, process characterization, and control strategy development / V. Janakiraman, C. Kwiatkowski, R. Kshirsagar, T. Ryll, Y.M. Huang // *Biotechnology progress*. – 2015. – № 31(6). – P. 1623-1632.

159. Butler M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied microbiology and biotechnology*. – 2005. – V. 68(3). – P. 283-291.

160. Jain E. Upstream processes in antibody production: Evaluation of critical parameters / E. Jain, A. Kumar // *Biotechnology Advances*. – 2008. – V. 26(1). – P. 46-72.

161. Лобанова Н.В. Оптимизация процессов культивирования эукариотических клеток-продуцентов на основе линии снo при производстве биофармацевтических препаратов / Н.В. Лобанова, А.А. Нурбаков, Е.Н. Сауткина, Р.А. Хамитов, Ю.А. Серегин // *Биотехнология*. – 2013. – №1. – С. 8-25.

162. Kou T.C. Detailed understanding of enhanced specific productivity in Chinese hamster ovary cells at low culture temperature / T.C. Kou., L. Fan, Y. Zhou, Z.Y. Ye, X.P. Liu, L. Zhao, W.S. Tan // *Journal of bioscience and bioengineering*. – 2011. – V. 111(3). – P. 365-369.

163. Moore A. Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch cultures / A. Moore, J. Mercer, G. Dutina // *Cytotechnology*. – 1997. – Vl. 23. – P. 47-54.
164. Bedoya-López A. Effect of Temperature Downshift on the Transcriptomic Responses of Chinese Hamster Ovary Cells Using Recombinant Human Tissue Plasminogen Activator Production Culture / A. Bedoya-López, K. Estrada, A. Sanchez-Flores, O. T. Ramírez, C. Altamirano, L. Segovia, J. Miranda-Ríos, M. A. Trujillo-Roldán, N. A. Valdez-Cruz // *PLoS One*. – 2016. – V. 11(3).
165. Hendrick V. Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: a cell cycle phases analysis / V. Hendrick, P. Winnepeninckx, C. Abdelkafi // *Cytotechnology*. – 2001. – V. 36. – №. 1-3. – P. 71–83.
166. Fan L. Effect of culture temperature on TNFR-Fc productivity in recombinant glutamine synthetase-chinese hamster ovary cells / L. Fan, L. Zhao, Z. Ye, Y. Sun, T. Kou, Y. Zhou, W.S. Tan // *Biotechnology letters*. – 2010. – V.32 (9). – P1239-1244.
167. Marchant R.J. Metabolic rates, growth phase, and mRNA levels influence cell-specific antibody production levels from in vitro-cultured mammalian cells at sub-physiological temperatures / R.J. Marchant, M.B. Al-Fageeh, M.F. Underhill, A.J. Racher, C.M. Smales // *Molecular biotechnology*. – 2008. – V. 39(1). – P. 69-77.
168. Gawlitzek M. Identification of cell culture conditions to control n-glycosylation site-occupancy of recombinant glycoproteins expressed in CHO cells / M. Gawlitzek, M. Estacio, T. Furch, R. Kiss // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2009. – V. 103(6). – P. 1164-1175.
169. Ahn W.S. Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells / W.S. Ahn, J.J. Jeon, Y.R. Jeong, S.J. Lee, S.K. Yoon // *Biotechnology and bioengineering*. – 2008. – V. 101(6). – P.1234-1244.

170. Gomez N. Culture temperature modulates aggregation of recombinant antibody in cho cells / N. Gomez, J. Subramanian, J. Ouyang, M.D. Nguyen, M. Hutchinson, V.K. Sharma, A.A. Lin, I.H. Yuk // *Biotechnology and bioengineering*. – 2012. – V. 109(1). – P. 125-136.
171. Zhang X. Culture temperature modulates monoclonal antibody charge variation distribution in Chinese hamster ovary cell cultures / X. Zhang, Y.T. Sun, H, T.L. Fan, D. Hu, J. Liu, X. Liu, W.S. Tan // *Biotechnology letters*. – 2015. – V. 37(11). – P. 2151-2157.
172. Kishishita S. Effect of temperature shift on levels of acidic charge variants in IgG monoclonal antibodies in Chinese hamster ovary cell culture / S. Kishishita, T. Nishikawa, Y. Shinoda, H. Nagashima, H. Okamoto, S. Takuma, H. Aoyagi // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2015. – V. 119(6). – P. 700-705.
173. Oguchi S. pH Condition in temperature shift cultivation enhances cell longevity and specific hMab productivity in CHO culture / S. Oguchi, H. Saito, M, Tsukahara, H. Tsumura // *Cytotechnology*. – 2006. – V. 52(3). – P. 199-207.
174. Brunner M. Investigation of the interactions of critical scale-up parameters (pH, pO₂ and pCO₂) on CHO batch performance and critical quality attributes / M. Brunner, J. Fricke¹, P. Kroll, C. Herwig // *Bioprocess and biosystems engineering*. – 2017. – V. 40(2). – P. 251–263.
175. Franco R. Influence of osmolarity and pH increase to achieve a reduction of monoclonal antibodies aggregates in a production process / R. Franco, G. Daniela, M. Fabrizio, G. Ilaria, H. Detlev // *Cytotechnology*. – 1999. – V. 29. – P. 11–25.
176. Gorfien S.F. Recombinant Protein Production by CHO Cells Cultured in a Chemically Defined Medium / S.F. Gorfien // *Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects*. – 1998. – V. 9. – P. 247-252.
177. Devasahayam M. Factors affecting the expression of recombinant glycoproteins. *The Indian journal of medical research*. – 2007. – V. 126. – P. 22-27.

178. Pacis E., Yu M., Autsen J. Bayer R, Li F. Effects of cell culture conditions on antibody N-linked glycosylation-what affects high mannose 5 glycoform. *Biotechnology & bioengineering*. – 2011. – V. 108(10). – P. 2348-2358.
179. Robinson D. Characterization of a recombinant antibody produced in the course of a high yield fed-batch process / D.K. Robinson, C.P. Chan, Lp. C. Yu, P.K. Tsai, J. Tung, T.C. Seamans, A.B. Lenny, D.K. Lee, J. Irwin, M. Silberklang // *Biotechnology & bioengineering*. – 1994. – V. 44(6). – P. 727-735.
180. Rita A. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production / A. Rita Costa, M. Elisa Rodrigues, M. Henriques, J. Azeredo, R. Oliveira // *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. – 2010. – V. 74(2). – P. 127-138.
181. Abu-Absi S.F. Defining process design space for monoclonal antibody cell culture / S.F. Abu-Absi, L. Yang, P. Thompson, C. Jiang, S. Kandula, B. Schilling, A.A. Shukla // *Biotechnology & bioengineering*. – 2010. – V. 106(6). – P. 894-905.
182. Gorfien S.F. Optimized Nutrient Additives for Fed-Batch Cultures / S.F. Gorfien, W. Paul, D. Judd, L. Tescione, D.W. Jayme // *BioPharm International*. – 2003. – V. 16. – № 4. – P. 34-40.
183. Xie L. Integrated approaches to the design of media and feeding strategies for fed-batch cultures of animal cells / L. Xie, D.I. Wang // *Trends in biotechnology*. – 1997. – V. 15. – № 3. – P. 109-113.
184. Kim D.Y. Effects of supplementation of various medium components on Chinese hamster ovary cell cultures producing recombinant antibody / D.Y. Kim, J.C. Lee, H.N. Chang, D.J. Oh // *Cytotechnology*. – 2005. – V. 47. – P. 37-49.
185. Mendonça R.Z. Metabolic active-high density VERO cell cultures on microcarriers following apoptosis prevention by galactose/glutamine feeding / R.Z. Mendonça, S.J. Arrózio, M.M. Antoniazzi, J.M. Ferreira, C.A. Pereira // *Journal of biotechnology*. – 2002. – V. 97. – №. 1. – P. 13-22.

186. Wlaschin K.F. Engineering cell metabolism for high-density cell culture via manipulation of sugar transport / K.F. Wlaschin, W.S. Hu // *Journal of biotechnology*. – 2007. – V. 131. – №. 2. – P. 168-176.
187. Altamirano C. Specific nutrient supplementation of defined serum-free medium for the improvement of CHO cells growth and t-PA production / C. Altamirano, A. Illanes, R. Canessa, S. Becerra // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2006. – V. 9. – №. 1. – P. 61-67.
188. Fan Y. Amino Acid and Glucose Metabolism in Fed-Batch CHO Cell Culture Affects Antibody Production and Glycosylation / Y. Fan, I. Jimenez Del Val, C. Muller, J. Wagtberg Sen, S. K. Rasmussen, C. Kontoravdi, D. Weilguny, M. R. Andersen // *Biotechnology & bioengineering*. – 2015. – V. 112(3). – P. 521-535.
189. Lalonde M.E. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells / M.E. Lalonde, Y. Durocher // *Journal of biotechnology*. – 2017. – V. 251. – P. 128-140.
190. Jiang Z. Sodium butyrate stimulates monoclonal antibody over-expression in CHO cells by improving gene accessibility / Z. Jiang, S.T. Sharfstein // *Biotechnology & bioengineering*. – 2008. – V. 100(1). – P.189-194.
191. Durocher Y. Expression systems for therapeutic glycoprotein production / Durocher Y., Butler M. // *Current opinion in biotechnology*. – 2009. – V. 20(6). – 700-707.
192. Yang W.C. Addition of valproic acid to CHO cell fed-batch cultures improves monoclonal antibody titers / W.C. Yang, J. Lu, N.B. Nguyen, A. Zhang, N.V. Healy, R. Kshirsagar, T. Ryll, Y.M. Huang // *Molecular biotechnology*. – 2014. – V. 56(5). – P. 421-428.
193. Sung Y.H. Effect of sodium butyrate on the production, heterogeneity and biological activity of human thrombopoietin by recombinant Chinese hamster ovary cells / Y.H. Sung, Y.J. Song, S.W. Lim, J.Y. Chung, G.M. Lee // *Journal of biotechnology*. – 2004. – V. 112(3). – P. 323-335.

194. Jiang Z. Sodium butyrate stimulates monoclonal antibody over-expression in CHO cells by improving gene accessibility / Z. Jiang, S.T. Sharfstein // *Biotechnology & bioengineering*. – 2008. – V. 100(1). – P. 189-194.
195. Sunley K. Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest / K. Sunley, M. Butler // *Biotechnology advances*. – 2010. – V. 28 (3). – P. 385-394.
196. Kim N.S. Overexpression of bcl-2 inhibits sodium butyrate-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells resulting in enhanced humanized antibody production / N.S. Kim, G.M. Lee // *Biotechnology & bioengineering*. – 2000. – V.71 (3). – P. 184-193.
197. Kim N.S. Inhibition of sodium butyrate-induced apoptosis in recombinant Chinese hamster ovary cells by constitutively expressing antisense RNA of caspase-3 / N.S. Kim, G.M. Lee // *Biotechnology & bioengineering*. – 2002. – V. 78. – P. 217-228.
198. Liu C. Pentanoic acid, a novel protein synthesis stimulant for chinese hamster ovary (CHO) Cells / C. Liu, I. Chu, S. Hwang // *Journal of bioscience and bioengineering*. – 2001. – V. 91(1). – P. 71-75.
199. Yoon S.K. Application of sodium propionate to the suspension culture of Chinese hamster ovary cells for enhanced production of follicle-stimulating hormone / S.K. Yoon, Y.H. Ahn // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. – 2007. – V. 12. – №. 5. – P. 497-501.
200. Gupta S.K. Sophisticated Cloning, Fermentation, and Purification Technologies for an Enhanced Therapeutic Protein Production: A Review / Gupta S.K., Shukla P. // *Front Pharmacol*. – 2017. – V.8. – P. 419.
201. Camire J. Enhanced production of recombinant proteins by a small molecule protein synthesis enhancer in combination with an antioxidant in recombinant Chinese hamster ovary cells / J. Camire, D. Kim, S. Kwon // *Bioprocess and biosystems engineering*. – 2017. – V. 40(7). – P. 1049-1056.
202. Backliwal G. Valproic acid: a viable alternative to sodium butyrate for enhancing protein expression in mammalian cell cultures / G. Backliwal, M.

Hildinger, I. Kuettel, F. Delegrange, D.L. Hacker, F.M. Wurm // *Biotechnology and bioengineering*. – 2008. – V. 101(1). – P.182-189.

203. Park J.H. Valeric acid induces cell cycle arrest at G1 phase in CHO cell cultures and improves recombinant antibody productivity / J.H. Park, S.M. Noh, J.R. Woo, J.W. Kim, G.M. Lee // *Biotechnology journal*. – 2016. – V. 11(4). – P. 487-496.

204. Yoshida H. Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch / H. Yoshida, T. Yoshizawa, F. Shibasaki, S. Shoji, H. Kanazawa // *Neurobiol. Dis.* – 2002. – V. 10. – №. 2. – P. 88-99.

205. Fiore M. Dimethyl sulfoxide restores contact inhibition-induced growth arrest and inhibits cell density dependent apoptosis in hamster cells / M. Fiore, F. Degrassi // *Experimental cell research*. – 1999. – V. 251. – №. 1. – P. 102-110.

206. Ling W.L. Improvement of monoclonal antibody production in hybridoma cells by dimethyl sulfoxide / W.L. Ling, L. Deng, J. Lepore, C. Cutler, S. Cannon-Carlson, Y. Wang, M. Voloch // *Biotechnology progress*. – 2003. – V. 19. – №. 1. – P. 158-162.

207. Liu C.H. Enhanced expression of various genes in recombinant Chinese hamster ovary cells in presence of dimethylsulfoxide / C.H. Liu, I.M. Chu, S.M. Hwang // *Biotechnology letters*. – 2001. – V. 23. – P. 1641–1655.

208. Fagain C. Use of stabilizing additives in stabilizing protein function. Springer: New York. – 1997. – P. 70-79.

209. Brown C. R. Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein / C. R. Brown, L. Q. Hong-Brown, J. Biwersi, A. S. Verkman, W. J. Welch // *Cell Stress Chaperones*. – 1996. – V. 1. – №. 2. – P. 117-125.

210. Takagi Y. The enhancement of antibody concentration and achievement of high cell density CHO cell cultivation by adding nucleoside / Y.

Takagi, T. Kikuchi, R. Wada, T. Omasa // *Cytotechnology*. – 2017. – V. 69(3). – P. 511-521.

211. Torkashvand F. Designed Amino Acid Feed in Improvement of Production and Quality Targets of a Therapeutic Monoclonal Antibody / F. Torkashvand, B. Vaziri, S. Maleknia, A. Heydari, M. Vossoughi, F. Davami, F. Mahboudi // *PLoS One*. – 2015. – V. 10(10).

212. Jefferis R. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnology progress*. – 2005. – V. 21(1). – P. 11–16.

213. Jefferis R. IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation / R. Jefferis, J. Lund, J.D. Pound // *Immunological reviews*. – 1998. – V. 163. – P. 59–76.

214. Arnold J.N. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins / J.N. Arnold, M.R. Wormald, R.B. Sim, P.M. Rudd, R.A. Dwek // *Immunological reviews*. – 2007. – V. 25. – P. 21–50.

215. Shinkawa T. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity / T. Shinkawa, K. Nakamura, N. Yamane, E. Shoji-Hosaka, Y. Kanda, M. Sakurada, K. Uchida, H. Anazawa, M. Satoh, M. Yamasaki, N. Hanai, K. Shitara // *The Journal of biological chemistry*. – 2003. – 278 (5). – P. 3466–3473.

216. Boyd P.N. The effect of the removal of sialic acid, galactose and total carbohydrate on the functional activity of Campath-1H / P.N. Boyd, A.C. Lines, A.K. Patel // *Molecular immunology*. – 1995. – V. 32 (17-18). – P. 1311-1318.

217. Raju T.S. Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Current opinion in immunology*. – 2008. – V. 20(4). – P. 471-478.

218. Karsten C.M. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1 / C.M. Karsten, Pandey M.K., Figge J.J. et al. // *Nature medicine*. – 2012. – V. 18(9). – P. 1401-1406.

219. Kaneko Y. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation / Kaneko Y., Nimmerjahn F., Ravetch J.V. // *Science*. – 2006. – V. 313(5787). – P. 670–673.
220. Wright A. In vivo trafficking and catabolism of IgG1 antibodies with Fc associated carbohydrates of differing structure / A. Wright, Y. Sato, T. Okada, K. Chang, T. Endo, S. Morrison // *Glycobiology*. – 2000. – V. 10(12). – P. 1347–1355.
221. Hossler P. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture / P. Hossler, S.F. Khattak, Z.J. Li // *Glycobiology*. – 2009. – V. 19. – №. 9. – P. 936–949.
222. Potapenko I.O. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression / I.O. Potapenko, V.D. Haakensena, T. Lüdersc, A. Hellanda // *Molecular oncology*. – 2010. – V. 4. – №. 2. – P. 98–118.
223. Crowell C.K. Amino acid and manganese supplementation modulates the glycosylation state of erythropoietin in a CHO culture system / C.K. Crowell, G.E. Grampp, G.N. Rogers, J. Miller, R.I. Scheinman // *Biotechnology & bioengineering* – 2007. – V. 96. – P. 538–549.
224. Elbein A. Kifunensine, a potent inhibitor of the glycoprotein processing mannosidase I / A. Elbein, J. Tropea, M. Mitchell, G.P. Kaushal // *The Journal of biological chemistry*. – 1990. – V. 265(26). – P. 15599–15605.
225. Zhou Q. Development of a simple and rapid method for producing non-fucosylated oligomannose containing antibodies with increased effector function / Q. Zhou, S. Shankara, A. Roy, H. Qiu, S. Estes, A. McVie-Wylie, K. Culm-Merdek, A. Park, C. Pan, T. Edmunds // *Biotechnology and bioengineering*. – 2008. – V. 99(3). – P. 652–665.
226. Pande S. Monensin, a small molecule ionophore, can be used to increase high mannose levels on monoclonal antibodies generated by Chinese hamster ovary production cell-lines / Pande S., Rahardjo A., Livingston B.,

Mujacic M. // *Biotechnology and bioengineering*. – 2015. – V. 112(7). – P. 1383-1394.

227. Mollenhauer H. Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity / H. Mollenhauer, D. Morre, L. Rowe // *Biochimica et biophysica acta*. – 1990. – V. 1031(2). – P. 225–246.

228. Paroutis P. The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation / P. Paroutis, N. Touret, S. Grinstein // *Physiology*. – 2004. – V. 19. – P. 207–215.

229. Machamer C. Monensin prevents terminal glycosylation of the N and O-linked oligosaccharides of the HLA-DR-associated invariant chain and inhibits its dissociation from the alpha-beta chain complex / C. Machamer, P. Cresswell // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1984. – V. 81(5). – P. 1287–1291.

230. Kousoulas K. Effect of the ionophore monensin on herpes simplex virus type 1-induced cell fusion, glycoprotein synthesis, and virion infectivity / Kousoulas K., Bzik D., Person S. // *Intervirology*. – 1983. – V. 20(1). – P.56–60.

231. Chatterjee S. Effect of monensin on Mason-Pfizer monkey virus glycoprotein synthesis / S. Chatterjee, J. Bradac, E. Hunter // *Virology*. – 1982. – V. 44(3). – P. 1003-1012.

232. Hossler P. Cell culture media supplementation of uncommonly used sugars sucrose and tagatose for the targeted shifting of protein glycosylation profiles of recombinant protein therapeutics. / P. Hossler, S. McDermott, C. Racicot // *Biotechnology progress*. – 2014. – V. 30(6). – P. 1419-1431.

233. Hossler P. Cell culture media supplementation of infrequently used sugars for the targeted shifting of protein glycosylation profiles / P. Hossler, C. Racicot, C. Chumsae // *Biotechnology progress*. – 2017. – V. 33(2). – P. 511-522.

234. Huang C. A robust method for increasing Fc glycan high mannose level of recombinant antibodies / Huang C., Lin H., Yang J. // *Biotechnology and bioengineering*. – 2015. – V. 112(6). – P. 1200-1209.

235. Wong D. Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures / D. Wong, K. Wong, L. Goh // *Biotechnology and bioengineering*. – 2005. – V. 89(2). – P. 164-177.
236. Pacis E. Effects of cell culture conditions on antibody N-linked glycosylation-what affects high mannose 5 glycoform. / E. Pacis, M. Yu, J. Autsen // *Biotechnology and bioengineering*. – 2011. – V. 108(10). P. 2348-2358.
237. Robinson D. Characterization of a recombinant antibody produced in the course of a high yield fed-batch process / D. Robinson, C. Chan, L. Yu // *Biotechnology and bioengineering*. – 1994. – V. 44(6). – P. 727-735.
238. Lux A. Impact of Immune Complex Size and Glycosylation on IgG Binding to Human FcγRs / A. Lux, X. Yu, C. N. Scanlan, F. Nimmerjahn // *Journal of immunology*. – 2013. – V. 190 (8). – P. 4315-4323.
239. Eibl R. Системы одноразового применения в производстве биопрепаратов: Quo Vadis? / R. Eibl, D. Eibl // *Одноразовые технологии для фармы*. – 2015. – № 4. – С. 51-55.
240. Werner S. Innovative Non-stirred Bioreactors in Scales from Milliliters up to 1000 Liters for Suspension Cultures of Cells using Disposable Bags and Containers / S. Werner, R. Eibl, C. Lettenbauer, M. Röhl, D. Eibl, J. De., X. Zhang, M. Stettler, S. Tissot, C. Bürkie, G. Broccard, M. Kühner, R. Tanner, L. Baldi, D. Hacker, F. Wurm // *A Swiss Contribution Swiss Biotech Chimia*. – 2010. – V. 64. – P. 819–823.
241. Voronina E.V. Development of genetic constructs for generation of adalimumab expressing cho cell line / E.V. Voronina, R.R. Shukurov, N.A. Litvinova, Y.A. Seregin, R.A. Khamitov, V.I. Shvetc // *XV International Scientific Conference «High-Tech in Chemical Engineering – 2014: Мат. науч. конф.* – М.: МИТХТ. – 2014. – С 180.
242. Voronina E. V. Design of a stable cell line producing a recombinant monoclonal anti-TNFα antibody based on a CHO cell line Producing Recombinant monoclonal antibody to tumor necrosis factor alfa based on CHO-DG44/ E.V.

Voronina, Y.A. Seregin, N.A. Litvinova, V.I. Shvets, R.R. Shukurov // SpringerPlus. – 2016.

243. Воронина Е.В. Создание штамма-продуцента антитела к фактору некроза опухоли альфа / Е.В. Воронина, Ю.А. Серегин, Н.А. Литвинова, В.И. Шве́ц, Шукуров Р.Р. VIII Московский международный конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития": Мат. науч. конф. – М.: ООО «Экспо-биохим-технологии». – 2015. – Т. 1. – С. 123-125.

244. Воронина Е.В. Оптимизация технологии культивирования клеток cho-dg44, экспрессирующих моноклональное антитело адалимумаб / Е.В. Воронина, Н.В. Лобанова, Н.А. Шамонов, Н. А. Романова, И. Н. Савинова, А.А. Клишин, Р.Р. Шукуров, В.И. Шве́ц, Ю.А. Серегин // VI Всероссийская молодежная научно-техническая конференция и школа молодых ученых "Наукоемкие химические технологии - 2015 ": Мат. науч. конф. – М.: МИТХТ. – 2015. – С.

245. Воронина Е.В. Подбор оптимальных условий культивирования клеток cho, экспрессирующих моноклональное антитело адалимумаб, в замкнутом объеме с подпиткой / Е.В. Воронина, Н.В. Лобанова, Н.А. Шамонов, Н. А. Романова, И. Н. Савинова, А.А. Клишин, Р.Р. Шукуров, В.И. Шве́ц, Ю.А. Серегин // Международная научно-практическая конференция Биотехнология в комплексном развитии регионов: Мат. науч. конф. – М.: ООО «Экспо-биохим-технологии». – 2016. – С.

246. Воронина Е.В. Оптимизация состава питательных сред для культивирования клеточной линии СНО - продуцента моноклонального антитела к фактору некроза опухолей альфа. / Е.В. Воронина, Н.В. Лобанова, А.В. Сухоженко, А.А. Клишин, И.Н. Савинова, Ю.А. Серегин // Биотехнология. – 2016. – Т.32. – №6. – С. 60-67.

247. Shields R. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ₃ and antibody-dependent cellular toxicity / R. Shields, J. Lai, R. Keck, L. O'Connell // The Journal of biological chemistry. – 2002. – V. 277(30). – P. 26733-26740.

248. Kanda Y. Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types. / Y. Kanda, T. Yamada, K. Mori // *Glycobiology*. – 2007. – V. 17(1). – P. 104-118.
249. Costa A.R. Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production / A.R. Costa, M.E. Rodrigues, M. Henriques, R. Oliveira // *Critical reviews in biotechnology*. – 2014. – V. 34(4). – P. 281-299.
250. Sha S. N-Glycosylation Design and Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies / S. Sha, C. Agarabi, K. Brorson, D.Y. Lee, S Yoon. // *Trends in biotechnology*. – 2016. – V. 34(10). – P. 835-846.
251. Voronina E.V. Adjustment of quality profile for monoclonal antibody adalimumab produced in cho cells / E.V. Voronina, N.V. Lobanova, A.A. Klishin, N.A. Romanova, R.R. Shukurov, N.A. Shamonov, Y.A. Seregin // *2nd Cell Culture & BioProcessing Forum: Mat. науч. конф. Berlin, Germany*. – 2015.
252. Лобанова Н.В. Оптимизация маннозных гликанов при культивировании продуцента антител к фактору некроза опухоли альфа / Н.В. Лобанова, Е.В. Воронина, А.В. Сухоженко, Чеботарева А., Гардеева, Черепушкин С.А., Ю.А. Серегин // *Биофармацевтический журнал*. – 2017. – Т. 9. – № 3. – С. 3-13.
253. Воронина Е.В. Сравнение эффективности культивирования клеток cho, экспрессирующих моноклональное антитело адалимумаб, в биореакторах различного типа / Е.В. Воронина, Н.В. Лобанова, И.Р. Яхин, Е.В. Горожанина, Т.А. Хаджиев, А.В. Чеботарева, В.И. Швец, Ю.А. Серегин // *Московский международный конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития"*: Мат. науч. конф. – М.: ООО «Экспо-биохим-технологии». – 2017. – С.
254. Vlasak J. Heterogeneity of monoclonal antibodies revealed by charge-sensitive methods / J. Vlasak, R. Ionescu // *Current pharmaceutical biotechnology*. – 2008. – V. 9(6). – P. 468-481.

255. Boswell C.A. Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics / C.A. Boswell, D.B. Tesar, K. Mukhyala, F.P. Theil, P.J. Fielder, L.A. Khawli // *Bioconjugate chemistry*. – 2010. – V. 21(12). – P. 2153-2163.
256. Chirino A.J. Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes / A.J. Chirino, A. Mire-Sluis // *Natural Biotechnology*. – 2004. – V. 22(11). – P. 1383-1391.
257. Antes B. Analysis of lysine clipping of a humanized Lewis-Y specific IgG antibody and its relation to Fc-mediated effector function / B. Antes, S. Amon, A. Rizzi, S. Wiederkum, Kainer M., Szolar O., Fido M., Kircheis R., Nechansky A. // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. – 2007. – V. 852(1-2). – P. 250-256.
258. Liu J. Assessing Analytical Similarity of Proposed Amgen Biosimilar ABP 501 to Adalimumab / J. Liu, T. Eris, C. Li, S. Cao, S. Kuhns // *BioDrugs*. – 2016. – V. 30. – P. 321–338.
259. Bandyopadhyay S. Physicochemical and functional characterization of a biosimilar adalimumab ZRC-319 / S. Bandyopadhyay, M. Mahajan, T. Mehta, A. K. Singh, A. ParikhAjit, K .Gupta, P. Kalita, M. Patel, S. K. Mendiratta // *Biosimilars*. – 2015. – V.5. P. 1–18.
260. Burdick R. Statistical Approaches to Assess Biosimilarity from Analytical Data / R. Burdick, T. Coffey, H. Gutka, G. Gratzl, H. D. Conlon, C.-T. Huang, M. Boyne, H. Kuehne // *The AAPS Journal*. – 2017. – V. 19 (3). – P. 4-14.
261. Singh S. K. Should charge variants of monoclonal antibody therapeutics be considered critical quality attributes? / S. K. Singh, G. Narula, A. S. Rathore // *Electrophoresis*. – 2016. – V. 37 (17-18). – P. 2338-2346.
262. Jung S.K. Physicochemical characterization of Remsima / S.K. Jung, K.H. Lee, J.W. Jeon, J.W. Lee, B.O. Kwon, Y.J. Kim, J.S. Bae, D.I. Kim, S.Y. Lee, S.J. Chang // *MAbs*. – 2014. – V. 6(5). – P. 1163-1177.