

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-115

РАЗРАБОТКА И МАСШТАБИРОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА**DEVELOPMENT AND SCALING OF CELL LINE CULTIVATION TECHNOLOGY PRODUCING MODIFIED SINGLE-DOMAIN ANTIBODIES**

Д. С. Полянский^{1,2}, Е. И. Рябова^{1,3}, А. А. Деркаев¹, В. В. Прокофьев¹,
М. А. Довгий¹, Д. В. Щебляков¹, А. П. Карпов¹, И. Б. Есмагамбетов¹

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

²Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова,
МИРЭА — Российский технологический университет, Москва

³Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К. И. Скрябина, Москва

D. S. Polyansky^{1,2}, E. I. Ryabova^{1,3}, A. A. Derkaev¹, V. V. Prokofiev¹,
M. A. Dovgiy¹, D. V. Shcheblyakov¹, A. P. Karpov¹, I. B. Esmagambetov¹

¹N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

²Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA — Russian Technological University, Moscow

³Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — K. I. Skryabin MVA, Moscow

✉ preclanc@mail.ru

Аннотация

Существует множество работ, демонстрирующих успешное применение модифицированных однодоменных антител для терапии и профилактики различных инфекционных заболеваний [1–7]. Мы показали возможность разработки и масштабирования технологии культивирования эукариотических продуцентов для получения препаратов на основе модифицированных однодоменных антител с вируснейтрализующей активностью против различных штаммов вируса SARS-CoV-2.

Abstract

There are many works demonstrating the successful application of modified single-domain antibodies for the therapy and prevention of various infectious diseases [1–7]. We have shown the possibility of developing and scaling up the technology of eukaryotic producers for obtaining drugs based on modified single-domain antibodies with virus-neutralizing activity against various strains of the SARS-CoV-2 virus.

Введение

В ФГБУ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России получено модифицированное однодоменное антитело P2C5-Fc, обладающее вируснейтрализующей активностью в отношении различных штаммов вируса SARS-CoV-2: B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), B.1.1.28/P.1 (Gamma) и B.1.1.529 (Omicron) [1], а также модифицированное однодоменное антитело B10-Fc, обладающее широким спектром вируснейтрализующей активности в отношении штаммов Wuhan D614G, Alpha, Beta, Gamma, Delta и Omicron BA.1, BA.2, BA.5 и более поздних вариантов — XBB.1, XBB.1.5, XBB.1.9, XBB.1.16, JN.1 и KS.1. вируса SARS-CoV-2 [8]. Далее были получены эукариотические продуценты антител P2C5-Fc (CHO-GamP2C5) и B10-Fc (CHO-GamB10) на основе клеток CHO и разработана технология их культивирования [9]. Цель данной работы — масштабирование технологии культивирования клеточных линий-продуцентов антител CHO-GamP2C5 и CHO-GamB10 на GMP-производстве.

Результаты

Для клона CHO-GamP2C5 оптимальные параметры процесса культивирования были достигнуты в биореакторе с осевым типом перемешивания при pH 7.2 с использованием понижения температуры с 37 до 33 °C начиная с достижения культуры клеток максимальной плотности и до конца культивирования, на питательной среде ActiPro™ в комбинации с питательными добавками 7A и 7B. Данная среда была лучшей из данного перечня: ActiPro™ (Cytiva, США), Fujifilm BalanCD® CHO Growth A (Irvine Scientific, США), Cosmos (Flora Bio, Турция), SFM4CHO (Cytiva, США), Dynamis™ AGT™ (Thermo Fisher Scientific, США), Capricorn (Capricorn Scientific,

Германия) после ряда экспериментов [9]. Для перехода в биореактор производственного масштаба (биореактор с осевым типом перемешивания) была использована система минибиореакторов Ambr® 250, с помощью которой подобраны оптимальные параметры по температуре и pH. Кроме того, в исследовании было выяснено, что показатели продуктивности для клеточной линии CHO-GamP2C5 в биореакторе с волновым и осевым типом перемешивания имеют разные значения. Для данного клона в биореакторе с волновым типом перемешивания наилучший результат по выходу целевого антитела был продемонстрирован при $T = 37^\circ\text{C}$ и составил 440 мкг/мл, а при культивировании в биореакторе с осевым типом перемешивания (минибиореактор Ambr® 250) наибольшая продуктивность была продемонстрирована при $T = 33^\circ\text{C}$ и составила 456 мкг/мл. После подбора оптимальных параметров культивирования для клеточной линии CHO-GamP2C5 было проведено культивирование в биореакторе с осевым типом перемешивания с рабочим объемом 200 л, выход целевого белка 564,4 мкг/мл.

Для культивирования клона CHO-GamB10 использовались китайские аналоги питательных сред и подпиток OptiVibro (ExCelbio, Китай), OptiVibro CE02 (ExCelbio, Китай), OptiVibro CE01 (ExCelbio, Китай), Eden B S601S (BioEngine, Китай), EmCD101 (Eminence, Китай), EmCD121 (Eminence, Китай). По итогам ряда экспериментов, исходя из графиков плотности, жизнеспособности клеточной суспензии на различных питательных средах и из конечного содержания целевого белка, наиболее перспективной из экспериментальных является питательная среда EmCD CHO 101 в комбинации с питательными добавками EmCD CHO Feed A 101 — 5 %, EmCD CHO Feed B 101 — 0,5 % (внесение через день). Также производилось изучение влияния масштабирования с колб до биореактора с волновым типом перемешивания и влияние понижения температуры культивирования на выход целевого белка. Для данного клона в биореакторе с волновым типом перемешивания наилучший результат по выходу целевого антитела был 400 мкг/мл, а при культивировании в биореакторе с осевым типом перемешивания (минибиореактор Ambr® 250) наибольшая продуктивность была 490 мкг/мл. Данный клон продемонстрировал наиболее высокое значение продуктивности при $T = 37^\circ\text{C}$ вне зависимости от типа перемешивания в биореакторе. После подбора оптимальных параметров культивирования для клеточной линии CHO-GamB10 было проведено культивирование в биореакторе с осевым типом перемешивания с рабочим объемом 50 л, выход целевого белка практически не изменился и составил 495 мкг/мл.

Таким образом, в нашей работе была разработана эффективная технология культивирования клеток CHO, стабильно продуцирующих однодоменные антитела, слитые с Fc-фрагментом IgG1 человека, для экстренной профилактики и терапии инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

Литература

1. Favorskaya I. A., Shcheblyakov D. V., Esmagambetov I. B. et al. Single-domain antibodies efficiently neutralize SARS-CoV-2 variants of concern // *Front. Immunol.* 2022. No. 13.
2. Есмагамбетов И. Б., Щебляков Д. В., Егорова Д. А. и др. Наноантитела — потенциальный терапевтический препарат против лихорадки Эбола // *Acta Naturae.* 2021. No. 13 (4). С. 53–63.
3. Derkaev A. A., Ryabova E. I., Esmagambetov I. B. et al. rAAV expressing recombinant neutralizing antibody for the botulinum neurotoxin type A prophylaxis // *Front. Microbiol.* 2022. No. 13.
4. Voronina D. V., Shcheblyakov D. V., Favorskaya I. A. et al. Cross-reactive Fc-fused single-domain antibodies to hemagglutinin stem region protect mice from group 1 influenza A virus infection // *Viruses.* 2022. No. 14 (11).
5. Panova E. A., Kleymenov D. A., Shcheblyakov D. V. et al. Single-domain antibody delivery using an mRNA platform protects against lethal doses of botulinum neurotoxin A // *Front. Immunol.* 2023. No. 14.
6. Godakova S. A., Noskov A. N., Vinogradova I. D. et al. Camelid VHHs fused to human Fc fragments provide long term protection against botulinum neurotoxin A in mice // *Toxins (Basel).* 2019. No. 11 (8).
7. Esmagambetov I. B., Ryabova E. I., Derkaev A. A. et al. rAAV expressing recombinant antibody for emergency prevention and long-term prophylaxis of COVID-19 // *Front. Immunol.* 2023. No. 14.
8. Shcheblyakov D. V., Favorskaya I. A., Dolzhikova I. V. et al. Ultra-potent RBM-specific single-domain antibody broadly neutralizes multiple SARS-CoV-2 variants with picomolar activity // *Int. J. Biol. Macromol.* 2025. No. 19.
9. Полянский Д. С., Рябова Е. И., Деркаев А. А. и др. Разработка технологии культивирования клеточной линии, продуцирующей однодоменное антитело, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека // *Тонкие химические технологии.* 2024. № 19 (3). С. 240–257.