

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АДЕНОВИРУСА 26 СЕРОТИПА В ПРОИЗВОДСТВЕННОМ МАСШТАБЕ: ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ

© 2024 г. А. В. Кирилин¹, Е. А. Гузов²*, В. В. Саповская³, А. А. Хоромская²,
Е. Н. Сечин³, А. В. Ерхов³, А. Б. Сарбасов¹, П. Ю. Романова¹,
Ю. М. Васильев¹, В. М. Колышкин², В. Г. Игнатьев¹

¹Акционерное общество “Р-Фарм”, Москва, 119421 Россия

²Ярославский завод готовых лекарственных форм, филиал АО “Р-Фарм”, Ярославль, 150061 Россия

³Ростовский завод активной фармацевтической субстанции,
филиал АО “Р-Фарм”, Ярославская область, Ростов, 152150 Россия

*e-mail: guzov@rpharm.ru

Поступила в редакцию 21.12.2023 г.

После доработки 19.01.2024 г.

Принята к публикации 13.02.2024 г.

Аденовирусные векторы представляют собой безопасную и высокоиммуногенную платформу для доставки вакцин. Нереплицирующиеся вирусные векторы широко используют в вакцинологии, что обусловлено такими свойствами, как высокая титражность, простота манипуляций, безопасность и иммуногенность, а также возможность масштабирования их производства и устойчивость к процедурам термообработки. Кроме того, вакцины на основе аденовирусных векторов вызывают устойчивый антигенспецифический клеточный и гуморальный иммунитет. Для выяснения условий культивирования аденовирусного вектора 26 серотипа (Ad26) в культуре клеток НЕК293 мы исследовали влияние множественности заражения на плотность, жизнеспособность клеток в процессе культивирования и их продуктивность, что позволило подобрать оптимальные параметры. Так, при заражении 1 л суспензии клеток НЕК293 Ad26-вектором в дозе $(3.20-4.16) \times 10^9$ копий ДНК гена гексона получили самый высокий выход вирусных частиц: около (2×10^{12}) /л. Кроме того, продемонстрировано, что замена глутамина в питательной среде на более устойчивый к деградации дипептид GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, США) приводит к уменьшению времени удвоения числа клеток до 22–24 ч при сохранении их жизнеспособности на уровне 92–98% в течение экспоненциальной фазы роста. Результаты этого исследования были использованы при производстве субстанции Ad26-компонента вакцины Гам-КОВИД-Вак, что позволило удовлетворить высокий спрос на вакцину во время кампании массовой иммунопрофилактики COVID-19 в Российской Федерации.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, аденовирусный вектор, вакцина, множественность заражения, НЕК293

DOI: 10.56304/S0234275824010058

SARS-CoV-2 – новый штамм коронавируса, выделенный в конце 2019 года в г. Ухань (Китай) и за несколько месяцев распространившийся по всему миру. В январе 2020 года Всемирная организация здравоохранения объявила вспышку заболевания, вызванного этим вирусом (COVID-19), чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение, а в марте охарактеризовала распространение заболевания как пандемию (<https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/transmission-of-sars-cov-2-implications-for-infection-prevention-precautions>).

Список сокращений: Ad26 (adenovirus serotype 26) – аденовирус серотипа 26; CPE (cytopathic effect) – цитопатическое действие; MOI (multiplicity of infection) – множественность заражения; БОЕ – бляшкообразующие единицы.

В начале пандемии заболевание преимущественно протекало как острая респираторная инфекция с различными клиническими формами – от легкой до тяжелой с серьезными осложнениями: пневмонией, острым респираторным дистресс-синдромом, острой дыхательной недостаточностью, острой сердечной недостаточностью, острым поражением почек, септическим шоком – и высокой летальностью ([https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov))). SARS-CoV-2 распространяется от человека к человеку воздушно-капельным путем или при прямом контакте. Базовое репродуктивное число (R_0) SARS-CoV-2, то есть потенциальное число зараженных

одним человеком, по данным различных публикаций варьировало в пределах от 2.68 [1] до 6.6 [2], а средний инкубационный период составлял 5.2 сут [3].

Вирусные векторы приобретают все большее значение в различных медицинских приложениях. Аденовирусные векторы получили большое распространение еще в конце прошлого века, а теперь привлекли внимание в связи с разработкой вакцин против COVID-19. Кроме того, аденовирусные векторы также используют в качестве инструмента для доставки таргетных препаратов в генной терапии и в качестве онколитических вирусов [4, 5].

Среди преимуществ аденовирусных векторов для производства вакцин — их благоприятный профиль безопасности, способность стимулировать сильный клеточный и гуморальный иммунный ответ, эффективная трансдукция как пролиферирующих, так и покоящихся клеток, относительная простота конструирования векторов, возможность быстрого получения вирусной продукции с высокими титрами и стабильность, что облегчает очистку, логистику и условия хранения лекарственных препаратов [6].

Важнейшее свойство для критерия безопасности аденовирусных векторов как средств доставки лекарственных препаратов — некомпетентность к репликации. Для достижения этой цели геном дикого типа аденовируса модифицируют различными способами. Векторы AdΔE1, наиболее часто используемые в производстве вакцин и генной терапии, несут делецию области E1 (400–3500 п.н.), которая необходима для репликации вируса. Кроме того, в этих векторах обычно удаляют ген E3, который не требуется для репликации, тем самым освобождая место для вставки трансгена [7].

В Российской Федерации коллективом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России в 2020 году была разработана инновационная векторная вакцина Гам-КОВИД-Вак для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой SARS-CoV-2. Вакцина была разработана на основе рекомбинантных аденовирусных векторов двух различных серотипов: 26 (rAd26) и 5 (rAd5). Оба вектора несут ген гликопротеина шипа (S) SARS-CoV-2 (rAd26-S и rAd5-S). В ходе двух открытых нерандомизированных исследований вакцины на здоровых взрослых добровольцах выявлена безопасность двух основных компонентов вакцины (rAd26-S и rAd5-S), хорошая переносимость и высокий гуморальный и клеточный иммунный ответ [8, 9].

Рекомбинантные аденовирусные векторы репликативно некомпетентны, так как из их генома удалены гены, вовлеченные в размножение вируса, и, следовательно, не дают продуктивной ви-

русной инфекции в клетках человека. Клетки HEK293 по принципу комплементарной экспрессии способны обеспечивать репликацию аденовирусов, так как стабильно трансформированы делетированным из генома рекомбинантного аденовируса участком [10]. К важнейшим параметрам высокопроизводительного культивирования вирусов в культуре клеток относятся следующие: температура, pH, концентрации в растворе кислорода, углекислого газа и глюкозы, — а также другие, которые влияют на выход и качество конечного продукта. Один из таких биохимических показателей — содержание аминокислоты глутамин в питательной среде для роста и поддержания клеток HEK293. Глутамин обеспечивает клетки азотом, который необходим для биосинтеза NAD, NADPH, нуклеотидов и белков, а также служит дополнительным источником энергии, участвуя в цикле трикарбоновых кислот [11–13]. Потребность клеток в этой аминокислоте в 3–40 раз (в зависимости от типа клеток) превышает потребность в других аминокислотах. Присутствие глутамина необходимо при культивировании клеток, требовательных к повышенному содержанию питательных компонентов в среде [14]. Однако многие исследователи сообщали, что глутамин легко разлагается в среде с образованием аммония, оказывающего токсическое воздействие на клетки [11, 15–17], поэтому часто используют его производные, более устойчивые к деградации, такие как L-аланил-L-глутамин или глицил-L-глутамин [18, 19]. Эти дипептиды, известные под коммерческим названием GlutaMAX™ (далее: глутамакс), термически стабильнее глутамина и выдерживают стерилизацию автоклавированием [20]. В клетках они расщепляются пептидазами, высвобождая глутамин и аланин или глицин, поэтому доступность глутамина зависит от пептидазной активности клеток, что определяет его невысокую внутриклеточную концентрацию и снижает риск образования токсичных уровней аммиака [21]. Таким образом, дипептиды могут заменять глутамин при длительном культивировании медленно растущих клеточных культур [22].

Еще один важный критерий при культивировании вирусов — множественность заражения (multiplicity of infection, MOI). Так, С. Джо с соавт. [23] показали, что важным фактором при культивировании вируса в культуре клеток HEK293 является подбор оптимального количества вносимого вирусного инокулята. А. Морозов с соавт. [24] выявили, что избыточная доза вируса может вызывать раннюю гибель клеток (цитотоксичность) и тем самым приводить к преждевременному завершению процесса, неполному заражению клеток, перерастанию биомассы, то есть к существенной потере продуктивности. Оценку эффективности заражения и накопления вирусных частиц можно проводить по графику расхода кислорода в ходе

процесса культивирования. Полное заражение клеточной биомассы характеризуется резким снижением потребления кислорода через 12–16 ч после заражения, без стадии медленного снижения, и последующей стадией стабилизации потребления. Оптимизировав этот параметр, авторам удалось достичь максимального выхода продукции вируса, но точных количественных данных они не предоставили. При работе с вирусом осповакцины А. Овчинников с соавт. [25] оптимизировали этот параметр для заражения суспензионной культуры клеток ВНК-21 и получили максимальный выход при МОИ 1–5 бляшкообразующих единиц (БОЕ)/клетка.

М. Шмаров и др. [26] оптимизировали стадии производства препарата на основе нереплицирующегося аденовирусного вектора, экспрессирующего ген Toll-подобного рецептора 5 типа и ген фрагмента белка флагелина, в суспензионной культуре клеток НЕК293. В результате оптимизации всех условий получен высокий выход целевого продукта с концентрацией (8×10^8 БОЕ/мл).

Как следует из анализа литературных источников, показатель МОИ имеет важное значение при культивировании вирусов, его значение подбирают экспериментальным путем в каждом конкретном случае.

Целью исследования была оптимизация условий культивирования аденовирусного вектора в суспензионной культуре клеток НЕК293 для повышения выхода вирусных частиц – как основы для получения вакцинного препарата. Основными оптимизируемыми параметрами были следующие: i) состав среды для культивирования зараженных клеток, а именно возможность замены глутамина на глутамакс, и ii) значение МОИ для rAd26.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Питательные среды и добавки

В работе использована питательная среда BalanCD НЕК293 (Irvine Scientific, США) и следующие питательные добавки: HyClone™ CellBoost™ 1 (HyClone, США), BalanCD НЕК293 Feed (Irvine Scientific), GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, США).

Вирусы

В работе использован рекомбинантный аденовирус 26 серотипа (rAd26, далее: Ad26), предоставленный ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, для разработки производства векторной вакцины Гам-КОВИД-В в промышленных масштабах. Препарат Ad26 был предоставлен в виде замороженной вирусной суспензии в питательной среде.

Клетки и их культивирование

В работе использовали клетки НЕК293. Процесс культивирования проводили в вышеуказанных средах с добавками или без в течение 3–4 сут. Отбор проб проводили ежедневно для подсчета клеток и оценки их жизнеспособности на автоматическом анализаторе клеток ViCell XR (Beckman Coulter, США). Концентрации глюкозы, лактата, растворенных O_2 и CO_2 , pH и осмоляльность среды определяли на биохимическом анализаторе BioProfile® FLEX2 Nova (Nova Biomedical Corporation, США).

Клеточную культуру размораживали в течение 3–5 мин на водяной бане, предварительно нагретой до 37°C. Криопротектор удаляли центрифугированием клеточной суспензии при 200 g и $20 \pm 2^\circ C$, а клетки переносили в колбу объемом 125 см³ и вносили свежую питательную среду в объеме 30 см³.

Экспериментальное суспензионное культивирование проводили в колбах Эрленмейера (Corning, США) объемом 1000 см³ с рабочим объемом культуральной жидкости 300 см³. Адгезивное культивирование проводили в культуральных флаконах объемом 50 см³. Клетки пересеивали при достижении плотности $(2.6–3.8) \times 10^6$ клеток/мл. Посевная плотность составляла $(0.5–0.6) \times 10^6$ клеток/мл, скорость вращения шейкера – 120 об/мин, температура культивирования – $37.0 \pm 0.5^\circ C$, концентрация CO_2 – 5–6%, pH – в интервале 6.9–7.3.

Заражение клеток Ad26-вектором

Для заражения культуры клеток использовали вирусную суспензию с известным содержанием числа копий гена гексона аденовируса. Для этого клетки НЕК293, выращенные в колбах объемом 1 л до концентрации $(1.10–1.20) \times 10^6$, заражали разными дозами Ad26 – в диапазоне $(1.6–6.4) \times 10^9$ копий ДНК/мл. Для заражения 1 л клеточной суспензии указанной выше плотности использовали 1 мл вирусосодержащей жидкости. Все эксперименты проводили в двух повторах.

Определение содержания ДНК Ad26

Для выделения ДНК использовали 100 мкл Ad26-содержащей суспензии, полученной при культивировании. В качестве отрицательного контроля использовали 100 мкл воды, обработанной диэтилпирикарбонатом. Тотальную ДНК из вирусосодержащей суспензии выделяли с использованием набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) по инструкции производителя.

Для приготовления стандартной калибровочной кривой использовали плазмиду, содержащую полноразмерный геном Ad26, с концентрацией от 10^2 до 10^8 вирусных геномов в образце. Число ко-

пий геномов Ad26 определяли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием набора qPCRmix-HS (ЗАО “Евроген”, Россия) согласно протоколу производителя. На основе последовательности гена гексона Ad26 были разработаны праймеры HexF (5'-CCCTCGGCTCGGGTTTC-GACCC-3') и HexR (5'-GTCGTTGCCGGGC-CAGCTGACC-3') и зонд Hex-probe: (R6G)-TACTCGGGCTCCATCCCTACCTCGA-(BHQ-2), которые синтезировали в компании ЗАО “Евроген”. Реакцию проводили на амплификаторе CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) с использованием канала Hex. Режим амплификации: 5 мин при 95°C (предварительная денатурация), затем 39 циклов по 3 этапа (денатурация при 95°C в течение 15 с, отжиг при 60°C в течение 20 с, элонгация при 72°C в течение 20 с). Результаты анализировали автоматически с использованием программного обеспечения для ПЦР-амплификатора. На основании полученных данных строили калибровочный график и определяли число копий гена гексона в исследуемой пробе.

Производили проверку пригодности системы. Система считалась адекватной при коэффициенте корреляции (r) ≥ 0.90 и эффективности $>80\%$. При невыполнении критериев приемлемости результаты эксперимента считались некорректными. По построенному графику находили среднее арифметическое двух образцов (повторов) для одной и той же концентрации ДНК (X , копий/мл):

$$X = (C_1 + C_2) / 2,$$

где C_1 и C_2 – концентрация ДНК в образце 1 и 2 соответственно, рассчитанная по калибровочному графику (копий/мл), 2 – число образцов.

Хроматографическая очистка Ad26

Для очистки Ad26 из вирусосодержащей суспензии использовали метод анионообменной хроматографии, описанный А. Костарным с соавт. [27], и мультимодальную хроматографию [28].

Определение содержания вирусных частиц

Содержание аденовирусных частиц в материале определяли спектрофотометрически по методу, описанному Maizel с соавт. [29], согласно которому поглощение 1 оптической единицы (о.е.) при длине волны 260 нм соответствует концентрации 1.1×10^{12} вирусных частиц/мл. Определение соотношения пустых и полных вирусных капсидов проводили по методу, описанному X. Yang с соавт. [30], после предварительного ультрацентрифугирования вирусосодержащей суспензии на роторе SW-28 (Optima XPN-90, Beckman Coulter) в течение 80 мин при 12°C и скорости 28000 об/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее при культивировании клеток НЕК293 в среде с добавкой глутамин мы выявили (*данные не представлены*) нестабильность их роста: время удвоения клеточной плотности увеличивалось с 24 ч, характерных для клеток НЕК293, до 35 ч, а жизнеспособность варьировала от 80 до 90%. Более того, регистрировали интенсивное накопление лактата и катионов аммония, а иногда и агрегацию клеточной суспензии. Известно, что концентрация ионов аммония выше 2 мМ оказывает негативное влияние как на рост клеток, так и на их продуктивность [31–35]. Проведенный нами биохимический анализ проб культуральной жидкости показал, что концентрация ионов аммония достигала 2 мМ, что, по-видимому, и было причиной плохого роста культуры клеток.

Теперь мы попробовали заменить глутамин на термически стабильный дипептид глутамакс в среде для клеток НЕК293, продуцирующих Ad26. И получили ожидаемый результат – устойчивый рост культуры. Кроме того, благодаря замене на глутамакс время удвоения числа клеток уменьшилось до 22–24 ч, а жизнеспособность сохранялась на уровне 92–98% в течение экспоненциальной фазы роста. Таким образом, появилась возможность достижения необходимых значений клеточной плотности для пересева в емкости большего объема и дальнейшего масштабирования производства.

Еще один важнейший параметр, требующий оптимизации для повышения продуктивности клеточной системы, – МОИ вируса для заражения клеток. Как описано выше, клетки НЕК293 в концентрации $(1.10–1.20) \times 10^6$ заражали разными дозами Ad26 – в диапазоне $(1.6–6.4) \times 10^9$ копий ДНК/мл – в расчете 1 мл вирусосодержащей жидкости на 1 л клеточной культуры. Пробы отбирали в момент заражения и через каждые 12 ч культивирования. При достижении содержания живых клеток на уровне $\sim 70\%$ от общего числа клеток процесс культивирования останавливали, так как дальнейшее снижение доли живых клеток приводит к их разрушению, снижению качества и потере вирусного материала. Обычно время заражения клеток Ad26-вектором составляло около 70 ч, что согласуется с приведенными в литературе данными – около 72 ч [26, 36].

В отобранных в процессе культивирования пробах определяли критичные параметры культивирования, такие как число копий гена гексона Ad26 (рис. 1), концентрация клеток (рис. 2) и доля в них живых клеток (рис. 3). Результаты проведенных исследований представлены на соответствующих иллюстрациях.

Как видно из полученных результатов, при использовании Ad26 в дозах 1.6×10^9 и 2.4×10^9 копий ДНК/мл выход аденовируса был невысокий, что, по-видимому, обусловлено низкой его кон-

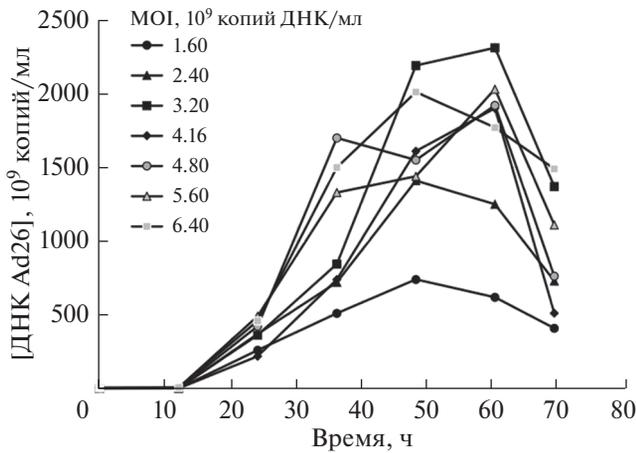


Рис. 1. Накопление гена гексона Ad26 в культуре клеток HEK293 в зависимости от дозы заражения (MOI).
Fig. 1. Accumulation of the Ad26 hexon gene in HEK293 cell culture depending on the infection dose (MOI).

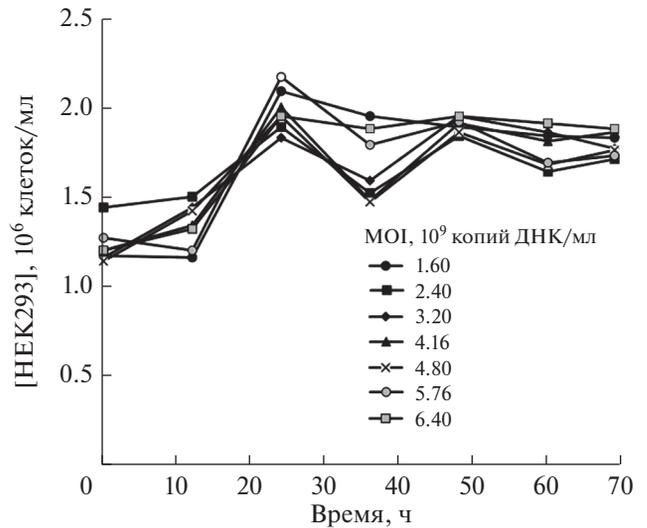


Рис. 2. Анализ изменения концентрации клеток HEK293 при заражении разными дозами Ad26.
Fig. 2. Analysis of changes in the concentration of HEK293 cells upon infection with different doses of Ad26.

центрацией на “входе”. За 69 ч инкубации концентрация клеток и доля в них неживых клеток снизились незначительно. При MOI 3.2×10^9 выход Ad26 был максимальным. После незначительного снижения через 36 ч заражения концентрация клеток восстановилась и постепенно начинала снижаться — вплоть до момента окончания культивирования. Жизнеспособность клеток постепенно снизилась до 70% к 69 ч культивирования. Число копий ДНК гена гексона, достигнув пика 2.19×10^9 к 48 ч культивирования, снизилось до 1.37×10^9 к 69 ч. При MOI 4.16×10^9 повышения числа копий вирусной ДНК не было, а при дальнейшем увеличении дозы до 4.8×10^9 и 5.76×10^9 падала и доля жизнеспособных клеток (ниже 70% к 69 ч инкубации). Следует заметить, что увеличение MOI выше 4.8×10^9 значительно увеличивает расход вирусного материала, что особенно нежелательно при масштабировании процесса, так как сразу “помещает” его в разряд нерентабельных.

Процесс культивирования клеток HEK293, зараженных выбранными дозами Ad26, масштабировали, используя волновой биореактор CES 100 (Tofflon, КНР) с объемом культуральной жидкости 50 л, осевые реакторы Sartorius (Sartorius, США) объемом 200 и 500 л и реактор Tofflon (Tofflon) объемом 2000 л. В табл. 1 представлены результаты анализа выхода вирусных частиц спектрофотометрическим методом с расчетом MOI в 1 л вирусосодержащей суспензии, полученной в вышеуказанных биореакторах.

Как видно из результатов случайным образом выбранных серий, полученный в реакторах различного типа и объема вирусный материал значительно не различался по выходу вирусных частиц. Использование установленного нами интервала

MOI для Ad26 дало хорошие результаты по выходу вирусных частиц и, как следствие, числа доз в расчете на 1 л вирусосодержащей суспензии, полученной как в волновом, так и в осевых биореакторах. Средняя концентрация вирусных частиц в полученном биоматериале была в интервале $(1.87-1.91) \times 10^{12}$ /мл, что достаточно для использования в качестве матрицы для наработки вакцины Гам-КОВИД-Вак.

Специфичность наработанного в реакторах Ad26-вектора проверяли в адгезивной культуре

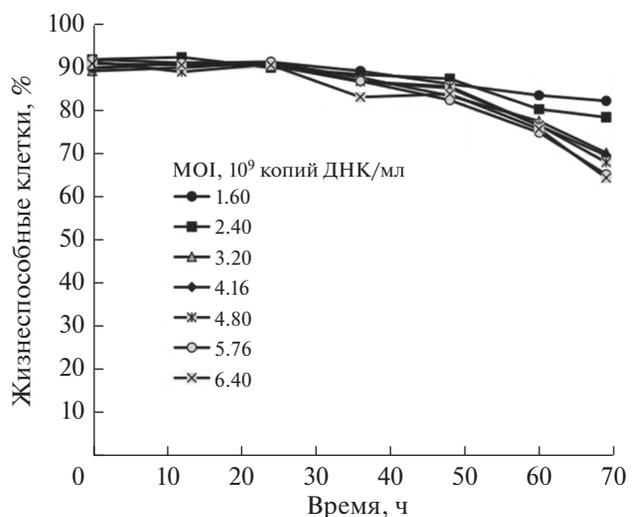


Рис. 3. Анализ жизнеспособности клеток HEK293 при заражении различными дозами Ad26.
Fig. 3. Viability analysis of HEK293 cells during infection with different doses of Ad26.

Таблица 1. Содержание вирусных частиц Ad26 и доз вакцины в 1 л вирусосодержащей суспензии, полученной при культивировании в различных типах реакторов
Table 1. Content of Ad26 viral particles and vaccine doses in 1 L of virus-containing suspension obtained by cultivation in various types of reactors

№ серии	Волновой биореактор, 50 л		Осевой биореактор					
			200 л		500 л		2 000 л	
	$N_{Ad26} \times 10^{12}$, число/мл*	число доз/л	$N_{Ad26} \times 10^{12}$, число/мл	число доз/л	$N_{Ad26} \times 10^{12}$, число/мл	число доз/л	$N_{Ad26} \times 10^{12}$, число/мл	число доз/л
1	1.91	317	1.89	2351	1.89	1906	1.91	1599
2	1.77	186	1.94	1197	1.87	1964	1.95	2141
3	1.95	359	1.84	1467	1.93	1289	1.90	1725
4	1.89	687	1.78	896	1.87	2436	1.88	2367
5	1.87	2537	1.82	2141	1.82	2383	1.91	2601
6	1.94	797	1.93	1627	1.90	1687	1.90	1775
7	1.91	1131	1.89	1565	1.85	899	1.94	2353
8	1.96	1798	1.82	2163	1.91	2098	1.91	1882
9	1.86	2307	1.88	1801	1.92	2005	1.85	2483
10	1.95	1653	1.91	906	1.94	1664	1.96	1782
11	1.93	1923	1.90	1421	1.98	926	1.90	2322
12	1.94	3050	1.84	1249	1.95	1201	1.88	2240
Среднее \pm SD	1.91 ± 0.05	—	1.87 ± 0.05	—	1.90 ± 0.04	—	1.91 ± 0.03	—

* *Примечание:* Указано число вирусных частиц в 1 мл вирусосодержащей жидкости.

* *Note:* The number of viral particles in 1 mL of virus-containing liquid is indicated.

клеток НЕК293, выращенной в плоских флаконах для культивирования объемом 50 мл (Corning). Кинетика развития цитопатического действия (cytopathic effect, CPE) Ad26 при культивировании в адгезивной культуре НЕК293 представлена на рис. 4. Как видно из рис. 4а, за 48 ч инкубации контрольные клетки образовали плотный монослой, заполнив всю свободную поверхность культурального флакона. Через 24 ч после инокуляции вируса клеточный монослой еще не нарушен, хотя часть клеток уже инфицирована и имеет округлую форму; ядра этих клеток четко выражены (рис. 4b). Через 48 ч после заражения (рис. 4c) все клетки инфицированы и начинается разрушение целостности монослоя, а через 72 ч монослой клеток полностью разрушен и идет его отслоение от поверхности флакона (рис. 4d).

Дальнейшая очистка анионообменной и мультимодальной хроматографией полученного Ad26-вектора позволила получить вирусную субстанцию высокой степени гомогенности. На рис. 5 представлены результаты аналитического центрифугирования в градиенте плотности CsCl вирусного материала до и после очистки. Как видно, до очистки фракция пустых и полных капсидов присутствуют в равных количествах (рис. 5а),

в то время как после очистки (рис. 5b) фракция пустых капсидов, то есть не содержащих ДНК (верхняя опалесцирующая зона), присутствует в незначительном количестве, а фракция полных вирусных частиц (нижняя опалесцирующая зона) представлена основной массой.

Один из ключевых показателей эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак — содержание вирусных частиц в готовой субстанции. Этот параметр оценивают методом спектрофотометрии при длине волны 260 нм. Для получения максимального выхода частиц Ad26 в культуре клеток НЕК293 необходимо соблюдение параметров культивирования. Так, одна из причин низкого роста культуры клеток — цитотоксичность ионов аммония, который образуется в результате катаболизма глутамин. Замена этого компонента питательной среды на термически стабильный дипептид глутамакс позволила решить эту проблему. В присутствии глутамакса существенно сократилось накопление аммония, повысилась жизнеспособность клеток и значения клеточной плотности достигли уровня, требуемого для последующего переосева.

Другим важным параметром, необходимым для эффективной репликации вируса в культуре клеток, является МОІ. Оптимизация дозы заражения

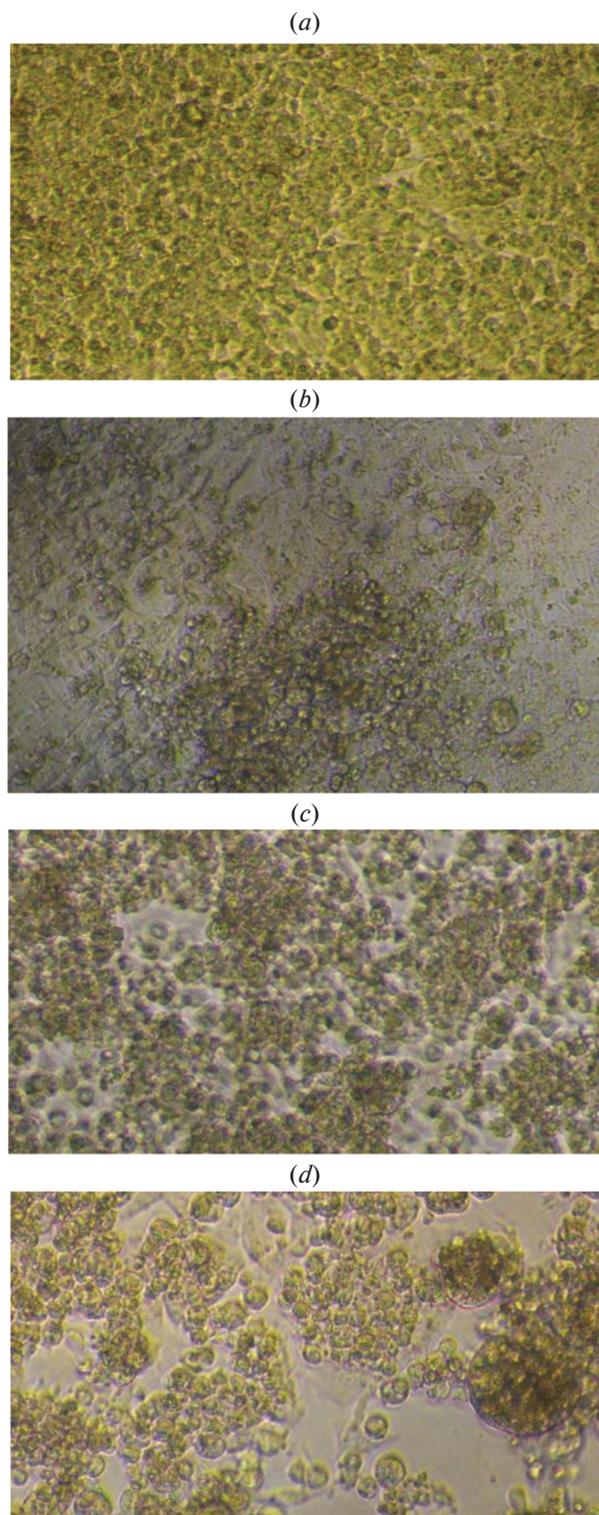


Рис. 4. Развитие цитопатического действия Ad26 на адгезивной культуре клеток НЕК293. (а) – Контрольные клетки (неинфицированные) после 48 ч культивирования; клетки через 24 (b), 48 (c) и 72 (d) ч после заражения.

Fig. 4. Development of the cytopathic effect of Ad26 on an adherent HEK293 cell culture. (a) – Control cells (uninfected) after 48 h of cultivation; cells 24 (b), 48 (c) and 72 (d) h after infection.

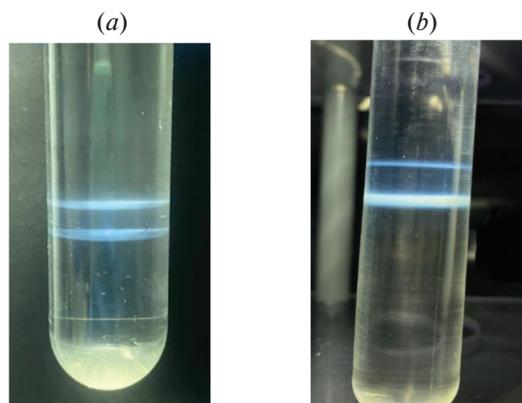


Рис. 5. Анализ наработанного в биореакторе Tofflon (Tofflon, КНР) объемом 2000 л Ad26-содержащего материала до (а) и после (b) двухэтапной хроматографической очистки. Показаны результаты ультрацентрифугирования препаратов в градиенте плотности CsCl: верхняя зона опалесценции содержит пустые капсиды, а нижняя – полные капсиды Ad26.

Fig. 5. Analysis of Ad26-containing material produced in a Tofflon bioreactor (Tofflon, China) with a volume of 2000 L before (a) and after (b) two-stage chromatographic purification. The results of ultracentrifugation of preparations in a CsCl density gradient are shown: the upper zone of opalescence contains empty capsids, and the lower zone contains full Ad26 capsids.

относится к ключевым вопросам этапа культивирования аденовирусных векторов. При культивировании клеток НЕК293 в 1-литровых колбах мы установили, что заражение 1 л клеточной культуры Ad26-вектором в дозе $(3.20-4.16) \times 10^9$ копий ДНК гена гексона позволяет получить вирусный материал в концентрациях, подходящих для изготовления вакцины. При последующем масштабировании технологии культивирования Ad26 в реакторах разных типов и объемов (вплоть до 2000 л) показано, что использование показателя MOI, выраженного в числе копий ДНК гена гексона Ad26, вполне подходит для оценки инфекционной дозы. При культивировании культуры клеток НЕК293, зараженной вектором Ad26 с MOI в установленном оптимальном диапазоне, в реакторах объемом 50–2000 л получены аденовирусные частицы в концентрации $(1.87-1.91) \times 10^{12}$ /л, что удовлетворяет требованиям, предъявляемым к векторной субстанции, при производстве вакцины Гам-КОВИД-Вак.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Проведенные исследования выполнены компанией АО “Р-Фарм” в рамках внутренних проектов за счет собственного финансирования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wu J.T., Leung K., Leung G.M. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. *Lancet*, 395(10225), 689–697. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30260-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30260-9)
2. Sanche S., Yen Ting Lin, Xu Ch., Romero-Severson E., Hengartner N., Ke R. High contagiousness and rapid spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Emerg. Infect. Dis.*, 2020, 26(7), 1470–1477. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200282>
3. Li Q., Guan X., Wu P., Wang X., Zhou L., Tong Y. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N. Engl. J. Med.*, 2020, 382(13), 1199–1207. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>
4. Wissing B.S., Faust N., Scheer N. Overview: manufacturing adenoviral vectors at large scale. *Genet. Eng. Biotechnol. News*, 2021, 41(10), 35. <https://doi.org/10.1089/gen.41.10.12>
5. Черенова Л.В., Каутиго Т.В., Саядян Х.С., Шмаров М.М. Разработка вакцин на основе аденовирусных векторов: обзор зарубежных клинических исследований. *Медицинская иммунология*, 2017, 19(2), 111–126. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2017-2-111-126>
6. Tasis N., Ertl H. C. J. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol. Ther.*, 2004, 10(4), 616–629. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.07.013>
7. Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Должикова И.В., Попова О., Щепляков Д.В., Гроусова Д.М., Джаруллаева А.Ш., Тухватулин А.И., Тухватулина Н.М., Щербинин Д.Н., Есмагамбетов И.Б., Токарская Е.А., Ботиков А.Г., Борисевич С.В., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Иммунобиологическое средство и способ его использования для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 (варианты). *Патент RU2720614C9*, Бюлл. № 4, опубл. 09.02.2021.
8. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., Grousova D.M., Erokhova A.S., Kovyrshina A.V., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Lubenets N.L., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Morozova L.F., Smolyarchuk E.A., Kryukov E.V., Babira V.F., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*, 2020, 396(10255), 87–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
9. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyrshina A.V., Lubenets N.L., Grousova D.M., Erokhova A.S., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Lubenets N.L., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Gushchin V.A., Smolyarchuk E.A., Zyryanov S.K., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L., the Gam-COVID-Vac Vaccine Trial Group. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*, 2021, 397(10275), 671–681. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8)
10. Ожаровская Т.А., Попова О., Зубкова О.В., Вавилова И.В., Почтовый А.А., Щепляков Д.В., Гуцин В.А., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Разработка и характеристика векторной системы на основе аденовируса обезьян 25-го серотипа. *Вестник РГМУ*, 2023, 1, 4–11. <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2023.006>
11. Portner R. Characteristics of mammalian cells and requirements for cultivation. In: *Cell and Tissue Reaction Engineering*. Eds Eibl R., Eibl D., Portner R., Catapano G., Czermak P. Verlag, Berlin, Heidelberg: Springer, 2009, 13–53. https://doi.org/10.1007/978-3-540-68182-3_2
12. Rodríguez-Hernández C.O., Torres-García S.E., Olvera-Sandoval C., Ramírez-Castillo F.Y., Muro A.L., Avelar-González F.J., Guerrero-Barrera A.L. Cell culture: history, development and prospects. *Int. J. Curr. Res. Acad. Rev.*, 2014, 2(12), 188–200.
13. Oyeleye O.O., Ogundeyi S.T., Ola S.I., Omitogun O.G. Basics of animal cell culture: foundation for modern science. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.*, 2016, 11(2), 6–16. <https://doi.org/10.5897/BMBR2016.0261>
14. Eagle H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 1955, 122(3168), 501–514. <https://doi.org/10.1126/science.122.3168.5>
15. Swain P., Nanda P.K., Nayak S.K., Mishra S.S. Basic techniques and limitations in establishing cell culture: a mini review. *Adv. Anim. Vet. Sci.*, 2014, 2(4S), 1–10. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2014/2.4s.1.10>
16. Pasieka A., Morgan J. Glutamine metabolism of normal and malignant cells cultivated in synthetic media. *Nature*, 1959, 183(4669), 1201–1202. <https://doi.org/10.1038/1831201a0>
17. Schneider M., Marison I.W., von Stockar U. The importance of ammonia in mammalian cell culture. *J. Biotechnol.*, 1996, 46(3), 161–185. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00196-4](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00196-4)
18. Yao T., Asayama Y. Animal-cell culture media: history, characteristics, and current issues. *Reprod. Med. Biol.*, 2017, 16(2), 99–117. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>
19. Eisenblatter T., Psathaki K., Nitz T., Galla H., Wegener J. Cell culture media: selection and standardization. In: *Cell Culture Models of Biological Barriers. In-Vitro Test*

- Systems for Drug Absorption and Delivery*. Ed. Lehr C.M. London: Taylor & Francis, 2002, 20–40.
<https://doi.org/10.1201/9780203219935>
20. Christie A., Butler M. Growth and metabolism of a murine hybridoma in cultures containing glutamine-based dipeptides. *GIBCO Focus*, 1994, 16(1), 9–13.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-7506-1845-8.50041-7>
 21. Van der Valk J., Brunner D., Smet K. De, Fex Svenningsen E., Honegger P., Knudsen L.E., Lindl T., Norberg J., Price A., Scarino M.L., Gstraunthaler G. Optimization of chemically defined cell culture media – replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicology In Vitro*, 2010, 24, 1053–1063.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.03.016>
 22. Трухан И.С. Питательная среда как ключевой фактор культивирования клеток млекопитающих. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*, 2018, 12(1), 165–172.
<https://doi.org/10.17513/mjpf.12541>
 23. Joe C.C.D., Jiang J., Linke T., Li Y., Fedosyuk S., Gupta G., Berg A., Segireddy R.R., Mainwaring D., Joshi A., Cashen P., Rees B., Chopra N., Nestola P., Humphreys J., Davies S., Smith N., Bruce S., Verbart D., Bormans D., Knevelman C., Woodyer M., Davies L., Cooper L., Kapranidou M., Bleckwenn N., Pappas D., Lambe T., Smith D.C., Green C.M., Venkat R., Ritchie A.J., Gilbert S.C., Turner R., Douglas A.D. Manufacturing a chimpanzee adenovirus-vectored SARS-CoV-2 vaccine to meet global needs. *Biotechnol. Bioeng.*, 2022, 119(1), 48–58.
<https://doi.org/10.1002/bit.27945>
 24. Морозов А.Н., Яхин И.Р., Стратонова Н.В., Куцкир М.В., Потеряев Д.А., Хамитов Р.А. Опыт масштабирования и интенсификации промышленного производства векторной аденовирусной вакцины Гам-КОВИД-Вак в лимитирующих условиях пандемии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*, 2022, 22(4), 382–391.
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-382-391>
 25. Овчинников А.В., Борисевич Г.В., Терентьев А.И., Пащенко Ю.И., Кротков В.Т., Марченко В.Н., Борисевич С.В., Кузнецов С.Л. Оптимизация накопления вируса вакцины при разработке противооспенных препаратов на основе культур клеток. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2019, 1, 107–112.
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-1-107-112>
 26. Шмаров М.М., Калугина И.А., Саморукова А.В., Алферова Н.С., Атауллаханов Р.Р., Еремина Н.В., Казей В.И. Способ производства препарата на основе нереплицирующегося вирусного вектора, экспрессирующего ген человеческого Toll-подобного рецептора и ген модифицированного белка флагеллина. *Патент RU2590588C1*, Бюлл. № 19, опубл. 10.07.2016.
 27. Костарной А.В., Кондратьев А.В., Ганчева П.Г., Смирнова Н.С., Ожаровская Т.А., Зубкова О.В., Попова О., Семихин А.С., Саморукова А.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Способ очистки рекомбинантного аденовируса 26 серотипа (Ad26). *Патент RU2745307C1*, Бюлл. № 9, опубл. 23.03.2021.
 28. *GE-Healthcare Multimodal Chromatography Handbook*. Sweden: GE Healthcare Bio-Sciences AB, General Electric Company, 2013, 115 p. https://wolfson.huji.ac.il/purification/Course92632_2014/Mixed-Mode/GE_MultimodalChromat.pdf.
 29. Maizel J.V., White D.O., Scharff M.D. The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology*, 1968, 36(1), 115–125.
[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(68\)90121-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(68)90121-9)
 30. Yang X., Agarwala S., Ravindran S., Vellekamp G. Determination of particle heterogeneity and stability of recombinant adenovirus by analytical ultracentrifugation in CsCl gradients. *J. Pharm. Sci.*, 2008, 97(2), 746–763.
<https://doi.org/10.1002/jps.21008>
 31. Canning W.M., Fields B.N. Ammonium chloride prevents lytic growth of reovirus and helps to establish persistent infection in mouse L cells. *Science*, 1983, 219, 987–988.
<https://doi.org/10.1126/science.6297010>
 32. Hansen H.A., Emborg C. Influence of ammonium on growth, metabolism and productivity of a continuous suspension Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol. Prog.*, 1994, 10, 121–124.
<https://doi.org/10.1021/bp00025a014>
 33. Ito M., McLimans W.F. Ammonia inhibition of interferon synthesis. *Cell Biol. Int. Rep.*, 1981, 5, 661–666.
[https://doi.org/10.1016/0309-1651\(81\)90185-5](https://doi.org/10.1016/0309-1651(81)90185-5)
 34. Reuveny S., Velez D., Macmillan J.D., Miller L. Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors. *J. Immunol. Methods*, 1986, 86, 53–59.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90264-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90264-4)
 35. Rajendra Y., Kiseljak D., Baldi L., Hacker D.L., Wurm F.M. Influence of glutamine on transient and stable recombinant protein production in CHO and HEK-293 cells. *BMC Proc.*, 2011, 5(Suppl. 8), P35.
<https://doi.org/10.1186/1753-6561-5-S8-P35>
 36. Ковырина А. В., Должикова И.В., Гроусова Д.М., Балясин М.В., Ботиков А. Г., Панина Л.В., Гордейчук И.В., Гуляев С.А., Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Попова О., Тухватулин А.И., Токарская Е.А., Симанова Я.В., Есмагамбетов И.Б., Щепляков Д.В., Евграфова И.М., Дерябин П.Г., Борисевич С.В., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Комбинированная векторная вакцина для профилактики ближневосточного респираторного синдрома индуцирует формирование длительного протективного иммунного ответа к коронавирусу БВРС-КоВ. *Иммунология*, 2020, 41(2), 135–143.
<https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-2-135-143>

Adenovirus Serotype 26 Cultivation on a Production Scale: Optimization of Conditions

A. V. Kirilin^a, E. A. Guzov^{b, #}, V. V. Sapovskaya^c, A. A. Khoromskaya^b, E. N. Sechin^c, A. V. Erkhov^c,
A. B. Sarbasov^a, P. Y. Romanova^a, Y. M. Vasiliev^a, V. M. Kolyshkin^b, and V. G. Ignatyev^a

^a*R-Pharm Joint Stock Company, Moscow, 119421 Russia*

^b*Yaroslavl Plant of Ready-to-Use Dosage Forms, Branch of R-Pharm JSC, Yaroslavl, 150061 Russia*

^c*Rostov Plant of Active Pharmaceutical Substance, Branch of R-Pharm JSC, Rostov, Yaroslavl oblast, 152150 Russia*

[#]*e-mail: guzov@rpharm.ru*

Abstract—Adenoviral vectors represent a safe and highly immunogenic platform for vaccine delivery. Non-replicating viral vectors are widely used in vaccinology due to properties such as high replicative activity, ease of manipulation, safety and immunogenicity, as well as scalability of their production and resistance to heat treatment procedures. In addition, vaccines based on adenoviral vectors induce sustained antigen-specific cellular and humoral immune responses. To elucidate the conditions for cultivating adenovirus vector serotype 26 (Ad26) in HEK293 cells, the effects of multiplicity of infection (MOI) on the cell maximum density, viability and productivity were investigated. As a result, optimal parameters for Ad26 cultivating were selected. The use of Ad26 at a dose in the range of $(3.20\text{--}4.16) \times 10^9$ hexon gene DNA copies to infect 1 L of HEK293 cell suspension allowed us to obtain viral material with a high yield of virus particles (about 2×10^{12} /L). In addition, it was demonstrated that replacing glutamine in the nutrient medium with the more degradation-resistant dipeptide GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, USA) resulted in a decrease in cell doubling time to 22–24 h while maintaining cell viability at 92–98% during the exponential growth phase. Results obtained were used in the manufacture of the Ad26-component of the Gam-COVID-Vac vaccine, which made it possible to satisfy the high demand for the vaccine during the mass immunization campaign against COVID-19 in the Russian Federation.

Keywords: SARS-CoV-2, adenovirus vector, vaccine, multiplicity of infection, HEK293