БИОТЕХНОЛОГИЯ, 2024, том 40, № 4, с. 55–62

ТЕХНОЛОГИЯ БИОПРЕПАРАТОВ

УДК 616.9-078:60

КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ CHO В БИОРЕАКТОРАХ РАЗНОГО ОБЪЕМА: ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ

© 2024 г. А. В. Кирилин[1, *], И. И. Цветкова[1], А. Б. Сарбасов[1], П. Ю. Романова[1], М. А. Цирулева[2], Е. А. Гузов[1], В. В. Саповская[3], А. В. Ерхов[3], М. С. Афанасьев[2], А. В. Исеркапов[4], В. М. Колышкин[1], В. Г. Игнатьев[1]

[1]Акционерное общество "Р-Фарм", Москва, 119421 Россия

[2]Ярославский завод готовых лекарственных форм, Ярославль, 150061 Россия

[3]Ростовский завод активной фармацевтической субстанции, Ростов, Ярославская область, 152150 Россия

[4]ООО "Спутник Технополис", Москва, 109316 Россия

**e-mail: av.kirilin@rpharm.ru*

Поступила в редакцию 08.05.2024 г.
После доработки 29.05.2024 г.
Принята к публикации 27.06.2024 г.

Рекомбинантные белки медицинского назначения, полученные с использованием генно-инженерной технологии, стали неотъемлемой частью фармакопеи разных стран. Для получения таких белков часто используют культуру клеток яичников китайского хомячка (CHO) – благодаря их высокой скорости пролиферации и простоте культивирования. В работе представлены результаты исследования по масштабированию процесса наработки лекарственного препарата бевацизумаб. Это рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело (моноАТ) подкласса IgG1, которое избирательно связывается и нейтрализует функциональную активность фактора роста сосудистого эндотелия человека (VEGF). Масштабирование процесса проводили в биореакторах объемом от 10 до 2000 л. Сначала были подобраны оптимальные условия культивирования клеток CHO в биореакторах объемом 10, 200, 500 и 2000 л. После этого проанализировали продукцию целевого белка – бевацизумаба. Отработанный процесс позволяет получать целевой продукт с выходом 1.4–2.3 мг/мл культуральной жидкости. В ходе масштабирования разработан промышленный технологический процесс, качественные и количественные характеристики которого не уступают лабораторным.

Ключевые слова: клетки CHO, культивирование, масштабирование, моноклональные антитела, бевацизумаб

DOI: 10.56304/S0234275824040045

Клетки яичника китайского хомячка (CHO) относятся к одной из основных клеточных систем, используемых в биофармацевтической промышленности для производства биологических препаратов, таких как моноклональные антитела (моноАТ). Основное преимущество клеток CHO, по сравнению с микробными клетками или клетками других млекопитающих, заключается в наличии у них машинерии посттрансляционной модификации белков, в том числе гликозилирования, что считается критически важным атрибутом качества биопрепаратов [1]. Наличие аберрантного гликанового профиля снижает эффективность, влияет на фармакокинетику белковых препаратов и изменяет их биологические свойства [2]. Кроме того, клетки CHO обладают пониженной восприимчивостью к человеческим вирусным инфекциям, что является дополнительным преимуществом по сравнению с клеточными линиями человеческого происхождения [3]. Клетки CHO могут расти в химически определенной среде, что снижает вероятность вариаций от партии к партии, и хорошо культивируются в суспензии, что облегчает масштабирование биопроцесса [4]. Несмотря на то, что достижения в разработке технологических процессов, инженерии клеточных линий и клональной селекции в значительной степени повысили выход рекомбинантных моноАТ, достижение стабильного качества продукции попрежнему остается серьезной проблемой. Для обеспечения необходимого метаболического состояния клеток, с целью достижения стабильного качества моноАТ, процесс культивирования клеток необходимо строго контролировать путем поддержания параметров в приемлемом диапазоне [5]. В настоящее время для культивирования

Список сокращений: моноАТ – моноклональные антитела.

клеток млекопитающих в суспензионной культуре или на носителях широкое использование получили биореакторы с перемешиванием. Они поддерживают высокие значения скоростей массо- и теплообмена и эффективное перемешивание. В таких системах на массоперенос и перемешивание влияет множество переменных, но к наиболее важным относятся скорость вращения мешалки, их тип и число, а также скорость потока газа [6]. Большинство промышленных микробных и эукариотических процессов относится к аэробным и в основном протекает в водной среде, содержащей соли и органические примеси. Обычно культуральный бульон имеет вязкую консистенцию с неньютоновским поведением. В этих процессах кислород – важный питательный компонент, который используется микроорганизмами для роста, поддержания и производства метаболитов, поэтому нехватка кислорода снижает производительность процесса. В связи с этим важно обеспечить адекватную доставку кислорода из газового потока в культуральную жидкость. Для этого необходимо, чтобы скорости переноса кислорода в реакторах различного объема были одинаковыми. Это имеет решающее значение для выбора, проектирования и масштабирования биореакторов [7, 8].

В аэробных биопроцессах, скорость поглощения кислорода имеет решающее значение для клеточной активности и служит индикатором изменений метаболического состояния культуры [9, 10], которое может быть вызвано изменением доступности субстратов [11–14]. На основании анализа литературы по влиянию условий культивирования на выход целевого продукта и его качество можно сделать вывод, что потребление кислорода является основополагающим фактором процесса, наряду с составом питательной среды и питательных добавок. Производство биологического препарата, основанное на процессе культивирования, предполагает последовательное увеличение объема сосуда культивирования и массы клеточной культуры. Увеличение объема культурального сосуда влечет за собой изменение его технических параметров и формы. Поскольку ход процесса определяется клетками, различия в ходе ферментации в аппаратах разного масштаба и конструкции следует искать в микроокружении клеток. Концентрации питательных веществ, продуктов метаболизма, температура и pH не зависят от масштаба. Более естественным выглядит предположение о различии в концентрациях растворенного кислорода и углекислого газа в клеточной суспензии.

Цель исследования состояла в подборе оптимальных параметров культивирования клеток CHO с целью масштабирования процесса получения лекарственного препарата Бевацизумаб.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Клетки и их культивирование

В работе использовали линию клеток яичника китайского хомячка CHO-K, продуцирующую бевацизумаб. Размораживание криопробирки с клеточной культурой проводили в течение 1–3 мин на водяной бане, предварительно нагретой до 37°C. Криопротектор удаляли центрифугированием клеточной суспензии при 200 об/мин и температуре 20 ± 2°C, надосадочную жидкость утилизировали, а в клетки вносили свежую питательную среду. В качестве питательной среды использовали BalanCD HEK293 (Irvine Scientific, США). Первый этап культивирования проводили в колбе объемом 125 мл, затем для получения необходимого количества клеток для засева 10-литрового реактора проводили еще два пассажа клеточной культуры в колбах объемом 500 и 1000 мл. Посевная клеточная плотность составляла (0.3–0.5) × 10^6 клеток/мл, скорость вращения шейкера – 120 об/мин, температура культивирования – 37.0 ± 0.5°C, концентрация CO_2 – 5–6%, pH – в интервале 6.9–7.1. Клетки пересевали в биореактор большего объема в логарифмической фазе роста при достижении плотности (2.6–3.8) × 10^6 клеток/мл. Подсчет числа клеток и оценку их жизнеспособности проводили на автоматическом анализаторе клеток ViCell XR (Beckman Coulter, США). Определение показателей содержания лактата, CO_2, pH среды проводили на биохимическом анализаторе BioProfile® FLEX2 Nova (Nova Biomedical Corporation, США). Процесс начинали с культивирования в реакторе объемом 10 л, а затем последовательно увеличивали до 200, 500 и 2000 л. В данных масштабах заданная температура, значение pH, растворенного кислорода (DO), плотность посевного материала, питательная среда и продолжительность культивирования были одинаковыми. Температуру поддерживали в районе 37°C, pH – в пределах 6.80–7.15 путем пропускания CO_2 или добавлением одномолярного раствора карбоната натрия. Уровень растворенного кислорода контролировали путем подачи воздуха и/или кислорода через просверленные отверстия или через спеченные диски с размером пор 2 или 20 мкм в пределах 40 ± ± 5%. Пеногаситель добавляли порционно – в минимальном количестве, необходимом для снижения пенообразования и во избежание смачивания выхлопного фильтра.

Выделение, очистка и анализ гликанового профиля антитела бевацизумаб

Культуральную жидкость, содержащую целевой продукт – моноАТ бевацизумаб, – получали центрифугированием клеточной суспензии при 3000 *g* в течение 40 мин при 4°C. Антитела выделяли с помощью хроматографического анализа на колон-

Таблица 1. Число и размеры пор и отверстий в разбрызгивателях биореакторов
Table 1. Number and size of pores and holes in bioreactor sprinklers

Разбрызгиватель	Биореактор			
	XDR10	STR200	STR500	SUB2000L
Микроразбрызгиватели (размер и число пор)	2 микропористых диска с порами 2 и 20 мкм	Микропористые диски с 100 порами размером 20 мкм	Микропористые диски с 500 порами диаметром 20 мкм	8 микропористых дисков с порами 20 мкм
Разбрызгиватель типа “открытая трубка” (размер отверстий)	2 диска с отверстиями диаметром 0.5 и 1.0 мм	Диск с отверстиями диаметром 0.8 мм		Кольцо с отверстиями диаметром 2 мм

ках HiTrap MabSelect (Cytiva, США), согласно рекомендациям производителя. Для очистки гликанов использовали подготовленные картриджи LudgerClean EB 10 (Ludger Ltd., Великобритания) и методики, указанные производителем. Для мечения гликанов использовали маркирующий набор LudgerTag TM2 AB Glycan Labeling Kit (Ludger Ltd.), окончательное выделение и очистку гликанов проводили на картриджах LudgerClean S Glycan Cleanup (Ludger Ltd.) согласно методике производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка процесса культивирования клеток требует оптимизации как независимых, так и зависимых от масштаба параметров. Независимые от масштаба параметры, такие как pH, температура, концентрация растворенного кислорода, осмоляльность и состав среды, обычно подбирают в мелкомасштабных экспериментах и поддерживаются постоянными при масштабировании [15]. Однако на рост и продуктивность клеток также влияют интенсивность перемешивания, концентрация углекислого газа и кислорода в биореакторе. Эти факторы зависят от размера и геометрической конфигурации прибора, а также его рабочих параметров, то есть скорости вращения крыльчатки, скорости подачи газов и рабочего объема. Таким образом, после подбора независимых от масштаба параметров культивирования клеток в условиях лаборатории при переходе в расширенный масштаб необходим этап оптимизации рабочих параметров для каждого из планируемых к использованию больших биореакторов. Подходы к оценке оптимальных рабочих параметров для масштабирования включают экспериментальные исследования роста клеток, их жизнеспособности в процессе культивирования, уровня необходимых и токсичных метаболитов в биореакторах разного объема [16–18], а также гидродинамических характеристик процесса [19].

В наших исследованиях разработки масштабирования моноАТ бевацизумаб использованы биореакторы с номинальным объемом 10, 200, 500 и 2000 л. Самый маленький биореактор XDR-10 (Cytiva) использован нами в качестве модели, на которой были подобраны все условия культивирования. По сути, это репрезентативная демасштабированная модель для процесса культивирования в объеме 200 л. К особенностям конструкции биореактора XDR-10 относятся следующие: низкое значение соотношения сторон высота/диаметр ($h/D = 1.5 : 1$), плоское дно и центрированная, установленная снизу трехлопастная крыльчатка с самым большим числом отношения диаметра крыльчатки к диаметру мешка биореактора – 0.67.

Биореакторы STR200 и STR500, производства компании “Sartorius” (Германия), имеют одинаковые значения всех соотношений, не плоское, а изогнутое дно, и двухуровневую крыльчатку с тремя лопастями на каждом уровне. Биореактор SUB2000L компании “Tofflon” (Китай) отличается тем, что имеет самое большую величину соотношения сторон высота/диаметр ($h/D = 2.2$) и 4-лопастную крыльчатку со смещением на 15° от центра. Различия биореакторов в разбрызгивателях представлены в табл. 1.

Как видно из данных табл. 1, биореакторы значительно различаются по числу и размеру пор и отверстий в разбрызгивателях. Таким образом, геометрические отличия четырех биореакторов, разная величина лопастей крыльчаток, разное число и величина отверстий разбрызгивателей – все это стало причиной оптимизации условий культивирования клеток CHO в каждом из них – для получения высокого выхода целевого продукта. Некоторые физические размеры и характеристики использованных биореакторов приведены в табл. 2.

На рис. 1 представлены ростовые характеристики клеток CHO, продуцентов моноАТ бевацизумаб, в течение 14 суток в биореакторах различного объема. Как видно из представленных данных, нам удалось подобрать условия эффективного культивирования в биореакторах объемом 10, 200, 500 и 2000 л с учетом их структурных и производственных параметров.

Таблица 2. Физические размеры и производственные характеристики биореакторов
Table 2. Physical dimensions and characteristics of bioreactors

Параметр*	Биореактор			
	XDR10	STR200	STR500	SUB2000L
Рабочий объем, л				
V_{max}	10	500	4.5	125
V_{min}	200	2 000	40	400
V_{max}/V_{min}	2.2	5	5	5
D, мм	203	585	815	1066
h, мм	304	1055	1467	2336
h/D	1.5	1.8	1.8	2.2
Крыльчатка (число уровней, число лопастей, угол наклона лопастей, угол смещения от оси реактора)	Одноуровневая, 3 лопасти под углом 40°	Двухуровневая, 3 лопасти на каждом уровне под углом 40°	Двухуровневая, 3 лопасти на каждом уровне под углом 40°	Одноуровневая, 4 лопасти под углом 40°, смещение на 15° от оси реактора
$D_{крыльчатка}/D_{мешок}$	0.67	0.38	0.38	0.34

* *Примечание:* V_{max} – максимальный объем; V_{min} – минимальный объем; D – диаметр; h – высота биореактора.
* *Note:* V_{max} – maximum volume; V_{min} – minimum volume; D – diameter; h – height of the bioreactor.

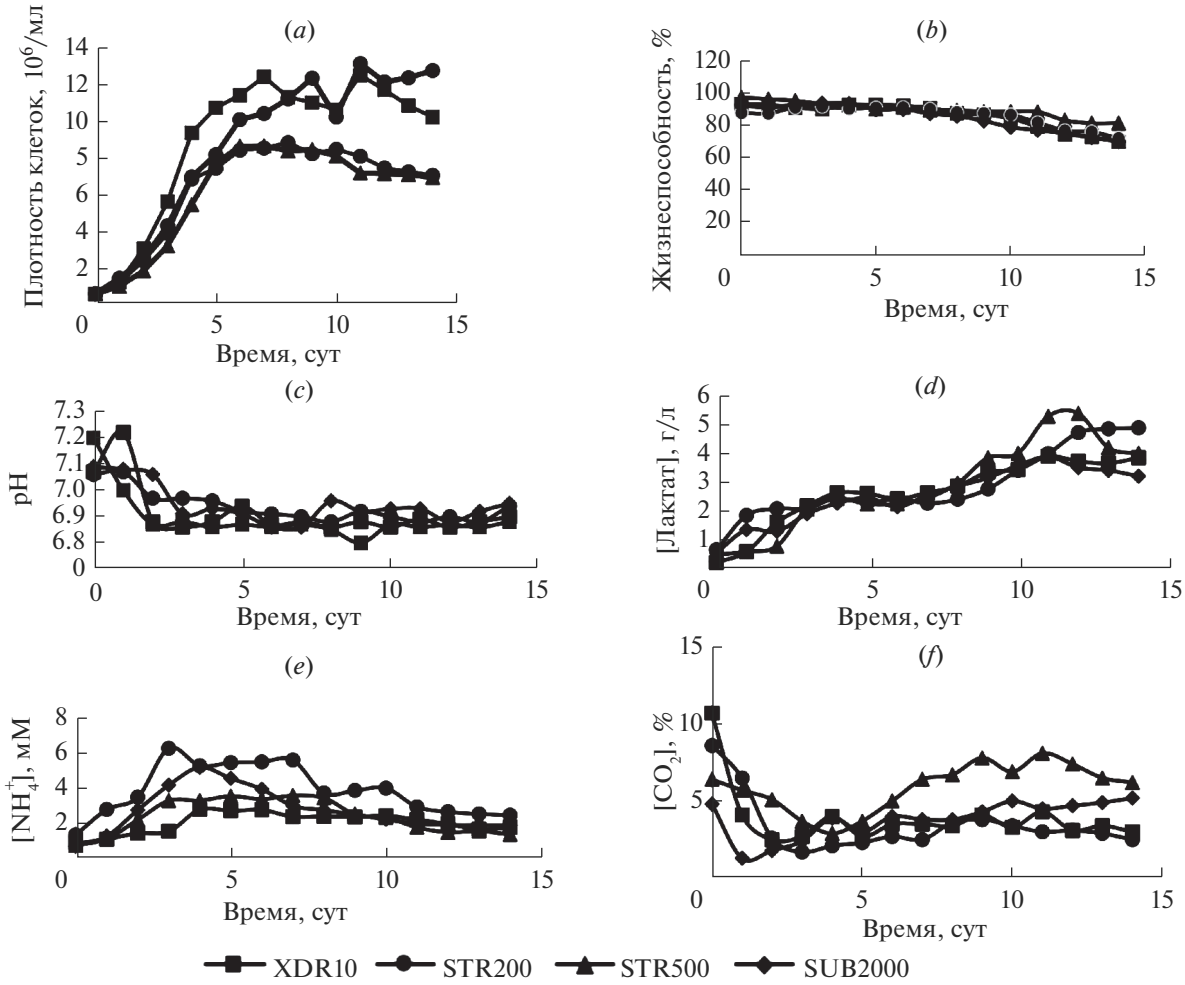

Рис. 1. Показатели процесса культивирования клеток CHO в биореакторах: рост (*a*) и жизнеспособность (*b*) клеток; pH (*c*); концентрация лактата (*d*), ионов аммония (*e*) и CO_2 (*f*).
Fig. 1. Indicators of the process of CHO cell cultivation in bioreactors: cell growth (*a*) and viability (*b*); pH (*c*); concentration of lactate (*d*), ammonium ions (*e*) and CO_2 (*f*).

Наибольшая скорость роста клеток была в биореакторах XDR10 и SUB2000L, достигая максимального значения, 13×10^6 клеток/мл, к 10 суткам. В биореакторах STR200 и STR500 максимальная плотность достигла 8.5×10^6 клеток/мл. Жизнеспособность клеток сохранялась в пределах 70% во всех биореакторах в течение 14 сут, значение pH среды держалось в диапазоне 6.80–7.15. Содержание лактата увеличивалось во всех биореакторах по мере увеличения числа клеток. Максимальный его уровень в биореакторах XDR10 и STR200 не превышал 4.0 г/л, в биореакторе STR500 – 4.9 г/л, в SUB2000L достигал 5.4 г/л. Концентрация ионов аммония находилось в пределах 2–4 мМ и только в биореакторе STR500 достигала значения 5.68 мМ. Концентрацию CO_2 при выбранных условиях перемешивания и газовой стратегии удерживали в пределах 4% в биореакторах XDR10, STR200, STR500 и в районе 8% в биореакторе SUB2000L. Это связано с тем, что в SUB2000L наибольшее соотношение сторон (h/D) и наименьшее отношение диаметра крыльчатки к диаметру мешка биореактора, поэтому для поддержания низких значений концентраций CO_2 необходимо значительно увеличивать скорость вращения крыльчатки и подачу воздуха. В биореакторах STR200 и STR500, благодаря наличию в них двухуровневой крыльчатки, которая обеспечивает хорошее перемешивание и удаление углекислого газа из среды, концентрация CO_2 оставалась невысокой.

На основании полученных результатов мы установили оптимальные параметры культивирования для биореакторов – все они представлены в табл. 3.

В качестве критериев, характеризующих успешность проведенного процесса культивирования в биореакторе, нами выбраны среднее время удвоения числа клеток (T_d) на экспоненциальной фазе роста (1–4 сут) и среднее значение продуктивности клеток. В табл. 4 представлены данные, характеризующие процесс и готовый продукт в биореакторах различного объема.

Как видно из приведенных данных, параметры культивирования, установленные для биореакторов, позволили добиться роста клеток со следующими средними значениями T_d: наименьшим,

Таблица 3. Оптимизированные параметры культивирования клеток CHO в биореакторах
Table 3. Optimized parameters for culturing CHO cells in bioreactors

Параметр	Модель и объем биореактора			
	XDR10 10 л	STR200 200 л	STR 500 500 л	SUB2000L 2000 л
Обороты крыльчатки (об/мин)	80	80	60	100
Подача кислорода	Сначала через диск с порами 0.5 мм, по мере увеличения плотности клеток переключается на диск с порами 20 или 2 мкм	Через микропористые диски с порами 20 мкм в течение всего срока культивирования, регуляция в каскадном режиме с поддержанием заданного значения O_2		
Подача воздуха	Через диск с порами 0.5 мм, по мере увеличения плотности клеток переключается на диск с порами 20 или 2 мкм	Через диск с отверстиями 0.8 мм в пределах 1.2–2.5 л/мин в зависимости от плотности клеток	Через диск с отверстиями 0.8 мм в пределах 1.5–4.5 л/мин в зависимости от плотности клеток	Через кольцо с отверстиями 2 мм в пределах 4.5–12.5 л/мин в зависимости от плотности клеток

Таблица 4. Показатели эффективности процесса культивирования клеток CHO в биореакторах различного объема
Table 4. Efficiency indicators of CHO cell culturing process in bioreactors of different volumes

Параметр	Показатель процесса*			
	XDR10	STR200	STR500	SUB2000L
T_d, ч	23.4 ± 0.3	27.8 ± 0.2	24.1 ± 0.2	28.2 ± 0.4
Продуктивность, мг/мл	2.6 ± 0.2	1.4 ± 0.3	1.5±0.2	2.1 ± 0.3

* *Примечание*: Приведены средние значения ± стандартное отклонение (SD), рассчитанные на основании трех независимых экспериментов.
* *Note*: Results are presented as mean ± SD calculated from three independent experiments.

Таблица 5. Профиль гликозилирования антитела бевацизумаб, полученного в биореакторе объемом 2000 л (SUB2000L)
Table 5. Glycosylation profile of Bevacizumab obtained in a 2000 L bioreactor (SUB2000L)

Серия	[Гликаны]*, %						[Бевацизумаб], мг/мл
	G_0	G_0F	M_5	G_1F	$G_1'F$	G_2F	
1	2.90	82.55	1.63	7.50	2.95	0.3	2.27
2	2.46	77.33	1.61	10.92	4.49	1.73	1.74
3	3.19	83.07	1.25	6.54	2.45	0.85	2.3
Нормативная документация	≤3	≥50	≤5	3–15	2–5	≤3	≥1.5

* *Примечание:* G_0 – нефукозилированная олигосахаридная цепь, не содержащая терминальных остатков Gal; G_0F – фукозилированная цепь без концевых остатков Gal; M_5 – высокоманнозная цепь, содержащая 5 остатков Man; G_1F – фукозилированная цепь с одним концевым остатком Gal; $G_1'F$ – изомер цепи G_1F по расположению концевого остатка Gal; G_2F - фукозилированная цепь с двумя концевыми остатками Gal.
* *Note:* G_0 – non-fucosylated oligosaccharide chain without terminal Gal residues; G_0F – fucosylated chain without terminal Gal residues; M5 – highly mannose chain containing 5 Man residues; G_1F – fucosylated chain with one terminal Gal residue; $G_1'F$ – isomer of the G_1F chain by the location of the terminal Gal residue; G_2F – fucosylated chain with two terminal Gal residues.

23.4 ± 0.3 ч, для биореактора XDR10 и наибольшим, 28.2 ± 0.4 ч, для биореактора SUB2000L.

Содержание целевого продукта в биореакторах STR200 и STR500 составило 1.4 ± 0.3 и 1.5 ± ± 0.2 мг/мл соответственно, в биореакторах XDR10 и SUB2000L – 2.6 ± 0.2 и 2.1 ± 0.2 мг/мл соответственно. Эти различия в продуктивности между биореакторами связаны, в первую очередь, с разной плотностью клеток. Другой возможной причиной различий в продуктивности биореакторов может быть уровень CO_2 в культуральной жидкости на этапе процесса культивирования. Так, по данным В. Елисеевой с соавт. [20], концентрация углекислого газа, растворенного в среде, является одним из ключевых компонентов, влияющих на рост и продуктивность клеток CHO. Д. Тюпа с соавт. [21] отмечают, что растворенный в питательной среде углекислый газ участвует в метаболических процессах клеток млекопитающих, поэтому он необходим для их нормального роста и развития. Оптимальный диапазон концентраций углекислого газа для клеток млекопитающих составляет 4–8%, что соответствует его парциальному давлению 30–55 мм рт.ст. Если содержание растворенного углекислого газа выходит за пределы указанных значений, это может приводить к подавлению роста и продуктивности клеток, а также к снижению их жизнеспособности. В биореакторе SUB2000L концентрация углекислого газа была выше, чем в других биореакторах. Кроме того, в биореакторе XDR10 удавалось поддерживать низкие концентрации ионов аммония и лактата, что также способствует высокой продуктивности клеточной культуры.

Успешность проведенного процесса масштабирования была подтверждена анализом профиля гликозилирования целевого белка трех экспериментальных серий, проведенных в биореакторе объемом 2000 л. Данные представлены в табл. 5.

Как видно из данных, представленных в табл. 5, профиль гликозилирования продукта, полученного в биореакторе объемом 2000 л, соответствует нормативным требования.

В результате проведенного исследования успешно масштабирован процесс культивирования клеток CHO, продуцирующих бевацизумаб, в биореакторах объемом от 10 до 2000 л. С учетом различий физических параметров емкостей и крыльчаток биореакторов, размеров пор и числа разбрызгивателей газов были подобраны условия, которые позволили достигнуть высокой концентрации клеток: ~13 × 10^6 в 1 мл культуральной жидкости – к 10 суткам в биореакторах XDR10 и SUB2000L, а в биореакторах STR200 и STR500 максимальная плотность достигла 8.5 × 10^6/мл. Другим важным показателем процесса культивирования является время удвоения числа клеток на экспоненциальной фазе роста. Для клеток CHO этот параметр составляет 24 ч. В результате оптимизации условий культивирования наименьшее значение, 23.4 ± 0.3 ч, получено в биореакторе XDR10, а наибольшее, 28.2 ± 0.4 ч – в биореакторе SUB2000L. Эти различия, скорее всего, обусловлены высоким значением соотношения сторон и наименьшим для диаметра крыльчатки к диаметру емкости в биореакторе SUB2000L. Содержание лактата в биореакторе SUB2000L достигало 5.4 г/л, что было максимальным среди использованных емкостей и объясняется низким значением массообмена кислорода из-за малого соотношения диаметра крыльчатки к диаметру емкости. Увеличение скорости перемешивания до >100 об/мин для увеличения массообмена приводило к повышенному пенообразованию и повреждению клеток. Кроме того, в биореакторе SUB2000L содер-

жание CO_2 в питательной среде было выше, чем в 10-, 200- и 500-литровых. Максимальная концентрация углекислого газа достигла 8.1% на 11 сутки культивирования, что также объясняется соотношением диаметра крыльчатки и диаметра емкости, а также недостаточным объемом воздуха, продуваемым через просверленные отверстия. В других трех биореакторах содержание CO_2 поддерживалось на уровне 4%. Тем не менее все указанные различия в показателях культивирования для биореакторов различного объема не влияли на продуктивность и качество полученного целевого продукта. Так, среднее значение продуктивности было максимальным в биореакторах XDR10 и SUB2000L: 2.6 ± 0.2 и 2.1 ± 0.3 мг/мл соответственно. Гликановый профиль продукта, полученного в трех экспериментальных сериях в биореакторе объемом 2000 л, соответствовал требованиям нормативного документа.

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. *Radhakrishnan D., Robinson A.S., Ogunnaike B.A.* Controlling the glycosylation profile in mAbs using time-dependent media supplementation. *Antibodies* (Basel), 2017, 7(1), 1. https://doi.org/10.3390/antib7010001
2. *Helenius A., Aebi M.* Intracellular functions of *N*-linked glycans. *Science*, 2001, 291, 2364. https://doi.org/10.1126/science.291.5512.2364
3. *Berting A., Farcet M.R., Kreil T.R.* Virus susceptibility of Chinese hamster ovary (CHO) cells and detection of viral contaminations by adventitious agent testing. *Biotechnol. Bioeng.,* 2010, 106(4), 598–607. https://doi.org/10.1002/bit.22723
4. *Chu L., Robinson D.K.* Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.,* 2001, 12(2), 180–187. https://doi.org/10.1016/s0958-1669(00)00197-x
5. *Hong J.K., Lakshmanan M., Lee D.-Y.* Towards next generation CHO cell line development and engineering by systems approaches. *Curr. Opin. Chem. Eng.,* 2018, 22, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.coche.2018.08.002
6. *Pappenreiter M., Sissolak B., Sommeregger W., Striedner G.* Oxygen uptake rate soft-sensing via dynamic kLa computation: cell volume and metabolic transition prediction in mammalian bioprocesses. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2019, 7, 195. https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00195
7. *Garcia-Ochoa F., Castro E.G., Santos V.E.* Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, 27, 680–690. https://doi.org/10.1016/s0141-0229(00)00272-6
8. *Calik P., Yilgör P., Ayhan P., Demir A.S.* Oxygen transfer effects on recombinant benzaldehyde lyase production. *Chem. Eng. Sci.,* 2004, 59, 5075–5078. https://doi.org/10.1016/j.ces.2004.07.070
9. *Deshpande R.R., Heinzle E.* On-line oxygen uptake rate and culture viability measurement of animal cell culture using microplates with integrated oxygen sensors. *Biotechnol. Lett.,* 2004, 26, 763–767. https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000024101.57683.6d
10. *Wahrheit J., Nonnenmacher Y., Sperber S., Heinzle E.* Highthroughput respiration screening of single mitochondrial substrates using permeabilized CHO cells highlights control of mitochondria metabolism. *Eng. Life Sci.,* 2015, 15, 184–194. https://doi.org/10.1002/elsc.2014001
11. *Toye D., Galifi A., Salmon T., Marchot P., Verdin E., Crine M.* Influence of medium composition on oxygen transfer rate in animal cell culture. *Can. J. Chem. Eng.*, 2010, 88, 671–676. https://doi.org/10.1002/cjce.20302
12. *Niklas J., Schräder E., Sandig V., Noll T., Heinzele E.* Quantitative characterization of metabolism and metabolic shifts during growth of the new human cell line AGE1. HN using time resolved metabolic flux analysis. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2011, 34(5), 533–545. https://doi.org/10.1007/s00449-010-0502-y
13. *Young J.D.* Metabolic flux rewiring in mammalian cell cultures. *Curr. Opin. Biotechnol.,* 2013, 24, 1108–1115. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.04.016
14. *Zhang L., Zhang W., Wang C., Liu J., Deng X., Liu X., Fan L., Tan W.* Responses of CHO-DHFR cells to ratio of asparagine to glutamine in feed media: cell growth, antibody production, metabolic waste, glutamate, and energy metabolism. *Bioresour. Bioprocess,* 2016, 3, 1–12. https://doi.org/10.1186/s40643-015-0072-6
15. *Li C., Teng X., Peng H., Yi X., Zhuang Y., Zhang S., Xia J.* Novel scale-up strategy based on three-dimensional shear space for animal cell culture. *Chem. Eng. Sci.*, 2020, 212, 115329. https://doi.org/10.1016/j.ces.2019.115329
16. *Xing Z., Kenty B.M., Li Z.J., Lee S.S.* Scale-up analysis for a CHO cell culture process in large-scale bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.,* 2009, 103, 733–746. https://doi.org/10.1002/bit.22287
17. *Xu S., Hoshan L., Jiang R., Gupta B., Brodean E., O'Neill K., Seamans T.C., Bowers J., Chen H.* A practical approach in bioreactor scale-up and process transfer using a combination of constant P/V and vvm as the criterion. *Biotechnol. Prog.,* 2017, 33, 1146–1159. https://doi.org/10.1002/btpr.2489
18. *Yang J.-D., Lu C., Stasny B., Henley J., Guinto W., Gonzalez C., Gleason J., Fung M., Collopy B., Benjamino M., Gangi J., Hanson M., Ille E.* Fed-batch bioreactor process scale-up from 3-L to 2,500-L scale for monoclonal antibody production from cell culture. *Biotechnol. Bioeng.,* 2007, 98, 141–154. https://doi.org/10.1002/bit.21413

19. *Villiger T.K., Neunstoecklin B., Karst D., Lucas E., Stettler M., Broly H., Morbidelli M., Soos M.* Experimental and CFD physical characterization of animal cell bioreactors: from micro- to production scale. *Biochem. Eng. J.*, 2018, 131, 84–94. https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.12.004
20. *Елисеева В.В., Смирнов А.А., Мазалёв Д.А., Кувшинов В.А.* Влияние концентрации растворенного CO_2 и пузырьков газа на рост и метаболизм клеток CHO. *Терапевт*, 2021, 1, 21–26. https://doi.org/10.33920/MED-12-2101-04
21. *Тюпа Д.В., Морозов А.Н., Захаров З.В., Калёнов С.В., Кочелабов Р.А., Емельянов И.М.* Влияние экстремальных концентраций растворенного CO_2 на рост и метаболические характеристики клеток CHO в периодических и непрерывных процессах. *Бутлеровские сообщения,* 2017, 50(5), 126–133. https://doi.org/10.37952/ROI-jbc-01/17-50-5

Cultivation of CHO Cell Line in Bioreactors of Various Volumes: Technology Optimization

A. V. Kirilin[a, #], I. I. Tsvetkova[a], A. B. Sarbasov[a], P. Y. Romanova[a], M. A. Tsiruleva[b], E. A. Guzov[a], V. V. Sapovskaya[c], A. V. Erkhov[c], M. S. Afanasiev[b], A. V. Iserkapov[d], V. M. Kolyshkin[a], and V. G. Ignatyev[a]

[a]*Joint Stock Company R-Pharm, Moscow, 119421 Russia*
[b]*FDF and Biotechnological Substances Plant, Yaroslavl, 150061 Russia*
[c]*Pharmoslavl Research and Production Complex, Rostov, Yaroslavl oblast', 152150 Russia*
[d]*LLC "Sputnik Technopolis", Moscow, 109316 Russia*
[#]*e-mail: av.kirilin@rpharm.ru*

Abstract—Recombinant proteins for medical use obtained by genetic engineering technology have become an integral part of the pharmacopoeia of various countries. To obtain such proteins, Chinese hamster ovary (CHO) cell culture is widely used in modern biotechnology due to its high proliferation rate and ease of cultivation. Here, the process of scaling up the production of Bevacizumab, a recombinant humanized monoclonal antibody (mAb) of the IgG1 subclass that selectively binds to and neutralizes the functional activity of human vascular endothelial growth factor (VEGF), was studied. The process was scaled up in bioreactors with a volume of 10 to 2000 L. First, optimal conditions for culturing CHO cells in the 10-, 200-, 500- and 2000-liter bioreactors were selected. After that, the production of Bevacizumab was analyzed. The developed process allowed us to obtain the target protein with a yield of 1.4–2.3 mg/mL of the culture liquid. During scaling, an industrial technological process was developed, the qualitative and quantitative characteristics of which are not inferior to laboratory ones.

Keywords: CHO cells, cultivation, process scaling, monoclonal antibody, Bevacizumab