

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ НА ВЫХОД МОНОМЕРА МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА БЕВАЦИЗУМАБ

© 2025 г. А. В. Кирилин¹, *, А. А. Барина², Е. Н. Сечин², М. А. Цирулева³, А. В. Исеркапов³, В. В. Саповская², А. В. Ерхов², А. Б. Сарбасов¹, П. Ю. Романова¹, Е. А. Гузов⁴, В. М. Кольшкин⁴, В. Г. Игнатъев¹

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

²Ростовский завод активной фармацевтической субстанции, филиал АО “Р-Фарм”, Ярославская область, Ростов, 152150 Россия

³ООО “Спутник Технополис”, Москва, 109316 Россия

⁴Ярославский завод готовых лекарственных форм, филиал АО “Р-Фарм”, Ярославль, 150061 Россия

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

Поступила в редакцию 30.10.2024 г.

После доработки 20.11.2024 г.

Принята к публикации 22.11.2024 г.

Стабильность мономера моноклональных антител (моноАТ) после окончания культивирования — одна из ключевых задач при производстве этого вида биотехнологической продукции. Дело в том, что в процессе очистки культуральной жидкости (КЖ) клеток-продуцентов моноАТ и ее хранения между этапами очистки не удается избежать воздействия ряда факторов, которые могут быть разрушительными для мономерных целевых молекул. Исследовано влияние на выход и стабильность мономера моноАТ бевацизумаб условий хранения КЖ после окончания процесса культивирования, а также внесения перекиси водорода и цистеинсодержащего буфера. Установлено, что выход мономера после глубинной фильтрации из КЖ, отобранной в последний день культивирования, составлял $88.9 \pm 4.33\%$, а из КЖ, хранившейся в темноте при $2-6^{\circ}\text{C}$ в течение 1 недели, снижался до $74.0 \pm 3.84\%$. Снижение рН до значения 6.6 ± 0.1 и увеличение уровня растворенного кислорода до $60 \pm 10\%$ в КЖ, как собранной сразу после окончания культивирования, так и после хранения, не влияло на выход моноАТ. Также показано, что низкий выход белка на стадии очистки методом аффинной хроматографии обусловлен низкой нагрузкой на сорбент. Уровень белковой нагрузки необходимо подбирать экспериментально с учетом типа сорбента и условий проведения хроматографии.

Ключевые слова: моноклональные антитела, бевацизумаб, стабильность, глубинная фильтрация, аффинная хроматография, капиллярный электрофорез

DOI: 10.56304/S0234275825010077

Рекомбинантные моноклональные антитела (моноАТ) за последние 20 лет получили широкое распространение в качестве иммунотерапевтических средств при онкологических и иммунологических заболеваниях [1]. Например, бевацизумаб (Avastin®; F. Hoffmann—La Roche, Ltd., Швейцария) — гуманизированное моноАТ против фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), которое распознает все изоформы этого белка и не связывается с другими ангиогенными компонентами клетки, такими как фактор роста фибробластов (FGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF). Гипер-

экспрессию VEGF часто обнаруживают в различных опухолях, так что перспективы применения бевацизумаба огромны [2].

В настоящее время система экспрессии клеток китайского хомячка (СНО) — широко используемый субстрат в производстве препаратов антител. К преимуществам этой клеточной линии относятся возможность ее выращивания в суспензионной культуре, в бессывороточной среде, высокая продуктивность и биобезопасность [3, 4].

Рекомбинантные моноАТ экспрессируются клетками СНО и секретируются в культуральную жидкость (КЖ). По окончании процесса культивирования клетки отделяются от КЖ методом непрерывного проточного центрифугирования и/или глубинной фильтрации [5, 6]. Многие авторы от-

Список сокращений: АФХ — аффинная хроматография; КЖ — культуральная жидкость; моноАТ — моноклональное антитело; ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота; DO (dissolved oxygen) — растворенный кислород.

мечают снижение количества антител во время сбора КЖ. И это одна из ключевых проблем при производстве моноАТ бевацизунаб, так как снижается не только выход, но и качество целевого продукта [7, 8]. Причины получения некачественного целевого продукта могут быть разные: фрагментация за счет ферментативного расщепления [9, 10], окрашивание продукта за счет связывания с ионами металлов, добавляемых на стадии культивирования [11], агрегация при низком значении рН на стадии инактивации контаминирующих вирусов [12].

В 2010 году М. Trexler-Schmidt с соавт. [9] и У. Као с соавт. [10] обнаружили, что в процессе крупномасштабного культивирования клеток-продуцентов антител в молекулах целевого продукта уменьшается число межцепочечных дисульфидных связей. Теперь это доказанный факт, создающий проблемы для биотехнологической промышленности [7]. Снижение выхода антител происходит в результате высвобождения в КЖ тиоредоксина, тиоредоксинредуктазы, глутатионредуктазы, глутаредоксина, НАДФ и глутатиона. Эти ферменты и кофакторы высвобождаются при лизисе клеток в результате механического сдвига, возникающего при центрифугировании в непрерывном потоке и/или глубинной фильтрации во время операций по сбору КЖ [9, 13–15].

По данным некоторых авторов снижение содержания антител зависит от уровня растворенного кислорода (dissolved oxygen, DO), рН и окислительно-восстановительного потенциала культуры клеток [16, 17].

Кроме того, риск снижения уровня антител возрастает, если полученную КЖ помещают на время в одноразовые мешки из многослойной коэкструзионной пленки [15] или в резервуары из нержавеющей стали с небольшим пространством над жидкостью в процессе временного хранения [18].

М. Trexler-Schmidt с соавт. [9] для предотвращения восстановления дисульфидных связей в молекуле моноАТ проанализировали несколько способов: внесение ЭДТА в культуру перед сбором КЖ, внесение CuSO_4 в среду для культивирования клеток или перед сбором КЖ, внесение CuSO_4 в среду для культивирования клеток и одновременное снижение рН КЖ с 7.0 до 5.5. Эти методы были эффективны для предотвращения восстановления S-S-связей при 75%-ном лизисе клеток и выдержке КЖ в течение 2 сут при 20°C. Без вышеуказанных добавок дисульфидные связи в молекуле моноАТ полностью восстанавливались при хранении КЖ в течение 1 сут при 20°C. Кроме того, было показано, что L-цистин в концентрации 2.2 мМ эффективно предотвращал восстановление дисульфидных связей в молекуле IgG1 при лизисе 60% клеток-продуцентов [9].

М. Mun и др. [18] изучали влияние подачи воздуха в КЖ на восстановление S-S-связи в молекулах антител. Для этого была разработана мало-масштабная модель с использованием биореактора объемом 3 л – с целью имитировать условия производственного сосуда и возможностью применить нескольких стратегий распыления воздуха. Эти исследования позволили глубже понять взаимосвязь между уровнем лизиса клеток, потреблением кислорода и снижением концентрации антител. Авторы показали, что продувание КЖ воздухом предотвращает снижение уровня синтезированных антител.

Cheng Du и др. [19] разработали несколько стратегий для минимизации восстановления дисульфидных связей в антителах, включая химическое ингибирование восстанавливающих компонентов, поддержание аэрации до и после сбора КЖ и охлаждение осветленной КЖ во время хранения. Показано, что использование перекиси водорода как добавки в КЖ на стадии глубинной фильтрации позволяет существенно повысить уровень синтезированных антител без изменения их качественных характеристик. Кроме того, так как перекись водорода растворима в водных растворах и разлагается на воду и кислород, то удаление ее на последующих этапах очистки не требует дополнительных манипуляций. Таким образом, учитывая низкую стоимость и простоту использования перекиси водорода, отсутствие негативного влияния на качество целевого продукта, можно считать обработку перекисью водорода перспективным инструментом “гашения” восстановительного потенциала КЖ.

В. Mullan и др. [17] показали, что поддержание уровня DO имеет решающее значение для окисленных (невосстановленных) форм IgG в осветленной КЖ. Для поддержания уровня DO выше минимального значения они включили в процесс аэрируемую емкость с перемешиванием для сбора осветленной фракции КЖ после стадии глубинной фильтрации.

В. O'Mara и др. [15] установили, что глубинная фильтрация, используемая для удаления клеток из КЖ, оказывает значительное давление на клетки и приводит к их лизису. Для уменьшения восстановленных дисульфидных связей в молекуле антител авторами предложена простая стратегия снижения риска – путем увеличения воздушной прослойки над емкостью для поддержания достаточного уровня DO в осветленной КЖ.

Учитывая вышеприведенные данные по исследованиям причин снижения количества моноАТ в КЖ и путей преодоления этой проблемы, мы проанализировали разные способы повышения стабильности мономера моноАТ бевацизунаб в КЖ после окончания процесса культивирования

клеток СНО на стадии глубинной фильтрации и хроматографической очистки.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Клетки: культивирование и последующие манипуляции

В работе использовали линию клеток яичника китайского хомячка СНО-К, продуцирующую рекомбинантное моноАТ бевацизумаб (разработана АО «Р-Фарм», Россия). В качестве питательной среды использовали BalanCD НЕК293 (Irvine Scientific, США).

Культивирование клеток проводили в течение 14 сут в биореакторах STR200 и STR500 (Sartorius, Германия) объемом 200 и 500 л соответственно. После окончания процесса культивирования в КЖ снижали рН до 6.6 ± 0.1 и увеличивали уровень DO до $60 \pm 10\%$ путем прокачивания CO₂ и воздуха DO соответственно. Для стабилизации мономера в отобранные пробы добавляли 10% (v/v) цистеинсодержащего буфера следующего состава: 2 М Tris (Merck, Германия), 8 мМ L-цистин (Merck), 40 мМ L-цистеин гидрохлорид моногидрат (Scharlab, Испания), рН (8.2–8.6) – и перекись водорода («Химпром», Россия) до конечной концентрации от 5 до 20 мМ. Пробы, отобранные для эксперимента, хранили в темноте при 2–6°C в течение 1 недели.

Глубинная фильтрация

При проведении процесса глубинные фильтры устанавливали таким образом, чтобы на первом этапе происходила фильтрация КЖ через несколько параллельно установленных фильтров Alioth Alider HD01 (Alioth Biotech, Китай), а на втором – через фильтр Alioth Alider HA02 (Alioth Biotech). Механически перемешиваемую КЖ подавали на глубинные фильтры с помощью перистальтического насоса. В ходе всего процесса контролировали давление перед фильтром и после него, следя за тем, чтобы перепад давления на фильтре не превышал 2 бар.

Собранную систему промывали водой для инъекций (3–4 объема), а затем уравнивали 3–4 объемами фосфатного буфера (10 мМ Na-фосфат, 250 мМ NaCl, рН 7.0; ФБ). КЖ фильтровали, а оставшуюся в системе вытесняли тем же ФБ (3.0–4.5 объема). Осветленную КЖ пропускали через фильтр с размером пор 0.22 мкм или через капсульный фильтр с размером пор 0.22/0.45 мкм и помещали на хранение при 2–8°C (не более 5 сут).

Аффинная хроматография (АФХ)

Колонку HiScale 50 длиной 20 мм (Cytiva, США) с аффинным сорбентом WorkBeads AffimAb (Bio-

Works, Швеция) промывали водой для инъекций (4–5 объемов) со скоростью 90–120 см³/ч, а затем 0.1 М NaOH (~4 объема) со скоростью 110–130 см³/ч и оставляли в этом растворе на 10 мин. Колонку уравнивали ФБ (4–5 объемов, скорость 150–200 см³/ч) и наносили осветленную КЖ с той же скоростью, соблюдая рекомендации производителя (время контакта белка с сорбентом – не менее 6 мин, нагрузка – не более 20 мг белка/мл сорбента). Колонку промывали сначала 4–5 объемами ФБ, затем 3 объемами 10 мМ Na-фосфата (рН 6.0 ± 0.2) со скоростью потока 150–220 см³/ч. Сбор целевой фракции проводили при значениях оптической плотности от 100 mAu на восходящей ветви хроматографического пика (по UV-детектору) до 100 mAu на нисходящей ветви. Полученный элюат использовали на следующей стадии очистки.

Капиллярный электрофорез

В работе использовали систему капиллярного электрофореза PA 800 plus (Beckman Coulter, США), оборудованную PDA-детектором, и капилляры из плавного кварца без покрытия: длина – 30.2 см, внутренний диаметр – 50 мкм (Sciex/Beckman Coulter). Электрофорез проводили при длине волны детектора 220 нм, температуре капилляра 25°C, температуре системы ввода проб 10°C. Анализ всех отобранных проб проводили в двух повторах.

Электрофорез в полиакриламидном геле

Одновременно пробы анализировали методом электрофореза в 12.5%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Аликвоту препарата непосредственно перед анализом смешивали с буфером Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, США) в соотношении 1 : 1, инкубировали при 95°C в течение 5 мин и наносили на дорожку 10 мкл. Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере. В качестве маркера молекулярной массы белков использовали Precision Plus Protein Dual Color Standards, 10–180 kDa (Bio-Rad), а в качестве контрольного образца – препарат Avastin® (F. Hoffmann–La Roche, Ltd, Швейцария). Окрашивали гель Coomassie G-250 (Bio-Rad).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сохранение количества и качества мономера моноАТ в процессе и после окончания культивирования клеток-продуцентов относится к важнейшему показателю эффективности производства, поэтому мы изучили влияние изменения ряда условий на этапе посткультивирования на выход целевого продукта. Это введение стабилизирующих добавок в КЖ и варьирование условий

Таблица 1. Выход и чистота целевого продукта, полученного из КЖ, отобранной на разных стадиях процесса и при различных условиях хранения
Table 1. Yield and purity of the target product obtained from culture liquid (CL) collected at different stages of the process and under different storage conditions

№№ Пробы	Этап технологического процесса и внесенные изменения в условия процесса	Содержание мономера в пробе, %				
		до очистки		после очистки		
		время хранения пробы до начала анализа				
		1 сут	7 сут	1 сут	7 сут	
1	1.1	Окончание процесса культивирования	88.90 ± 4.33	н/а*	96.17 ± 3.68	н/а
	1.2		н/а	74.0 ± 3.84	н/а	97.42 ± 4.56
2	2.1	Настройки реактора изменены на следующие: рН 6.6 ± 0.1, DO 60 ± 10%	91.80 ± 3.61	н/а	97.58 ± 4.16	н/а
	2.2		н/а	73.70 ± 3.28	н/а	97.58 ± 4.62
3	3.1	Окончание глубинной фильтрации	98.40 ± 2.62	н/а	97.08 ± 5.26	н/а
	3.2		н/а	97.80 ± 4.72	н/а	88.16 ± 3.57
	3.3	Добавление 10% цистеинсодержащего буфера	97.60 ± 3.41	н/а	95.72 ± 4.73	н/а
	3.4		н/а	96.30 ± 4.56	н/а	95.03 ± 2.95
	3.5	Добавление 1 мМ H ₂ O ₂	97.50 ± 3.26	н/а	81.76 ± 3.48	н/а
	3.6		н/а	69.90 ± 4.87	н/а	96.27 ± 3.84
	3.7	Добавление 2 мМ H ₂ O ₂	98.60 ± 4.61	н/а	89.25 ± 5.23	н/а
	3.8		н/а	97.80 ± 3.54	н/а	95.33 ± 4.72
	3.9	Добавление 5 мМ H ₂ O ₂	96.50 ± 4.37	н/а	97.74 ± 4.55	н/а
	3.10		н/а	99.0 ± 5.41	н/а	92.50 ± 2.46
	3.11	Добавление 10 мМ H ₂ O ₂	97.30 ± 3.28	н/а	88.06 ± 3.65	н/а
	3.12		н/а	97.30 ± 3.50	н/а	90.58 ± 3.87
	3.13	Добавление 20 мМ H ₂ O ₂	98.20 ± 5.51	н/а	95.73 ± 4.88	н/а
	3.14		н/а	98.0 ± 4.28	н/а	90.38 ± 4.74

* *Примечание:* не анализировали.

* *Note:* not analyzed.

ее хранения до процедуры очистки синтезированного антитела.

Прежде всего мы исследовали влияние на выход мономера величины рН КЖ и снижения температуры после окончания процесса культивирования, а также введения потенциальных стабилизаторов структуры белков. В табл. 1 представлены сравнительные данные по выходу мономера моноАТ бевацизумаб и его стабильности в течение 1 недели хранения в КЖ. Как можно видеть по результатам контрольного эксперимента (1), за время хранения содержание мономера в КЖ снизилось более чем на 10%: с $88.9 \pm 4.33\%$ до $74.0 \pm 3.84\%$. Снижение рН КЖ до 6.6 ± 0.1 и повышение насыщения кислородом до $60 \pm 10\%$ к окончанию процесса культивирования незначительно повысило выход мономера,

отобранного сразу после окончания культивирования: с $88.9 \pm 4.33\%$ до $91.8 \pm 3.61\%$, — но не повлияло на его стабильность при хранении ($73.7 \pm 3.28\%$). Кроме того, из данных табл. 1 можно сделать вывод, что хранение в течение 1 недели очищенной на глубинных фильтрах КЖ не приводило к снижению выхода целевого продукта: для пробы 3.1, отобранной сразу после окончания глубинной фильтрации, это $98.4 \pm 2.62\%$, а для пробы 3.2, хранившейся в течение 1 недели, $97.8 \pm 4.72\%$.

При анализе выхода и стабильности мономеров, полученных из КЖ, в которой после окончания культивирования снижали рН до 6.6 ± 0.1 или повышали уровень DO до $60 \pm 10\%$, выявлено, что эти манипуляции не повлияли на выход целевого продукта. Оценить различия в чистоте этих

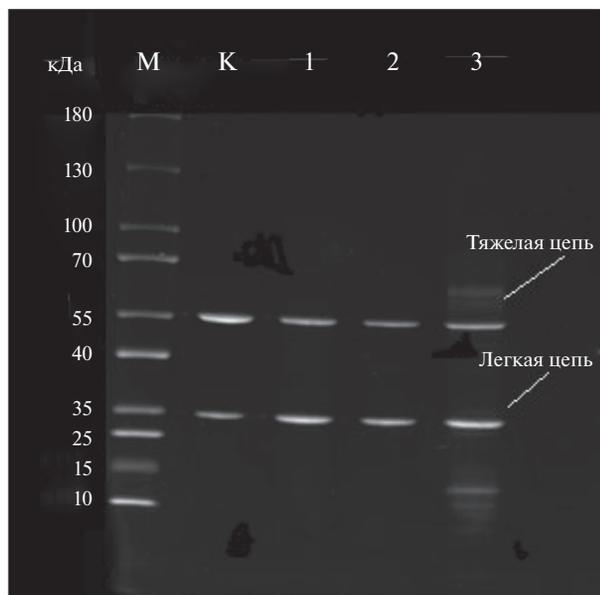


Рис. 1. Электрофоретический анализ образцов, полученных на стадиях выделения моноАТ бевацизумаб. Представлены результаты электрофореза в 12.5%-ном ПААГ-SDS (восстанавливающие условия). На каждую дорожку нанесен 1 мкг общего белка. М – маркеры молекулярной массы белков Precision Plus Protein Dual Color Standards, 10–180 kDa (Bio-Rad, США), К – стандартный образец бевацизумаба (F. Hoffmann–La Roche, Ltd., Швейцария), 1 – КЖ после окончания процесса культивирования, 2 – КЖ после глубинной фильтрации (осветленная), 3 – осветленная КЖ с добавлением цистеинсодержащего буфера.

Fig. 1. Electrophoretic analysis of samples obtained at the stages of bevacizumab isolation. The results of electrophoresis in 12.5% SDS-PAAG (reducing conditions) are presented. Each lane contains 1 μ g of total protein. М – protein molecular mass markers Precision Plus Protein Dual Color Standards, 10–180 kDa (Bio-Rad, USA), К – bevacizumab standard sample (F. Hoffmann–La Roche Ltd., Switzerland), 1 – culture liquid (CL) after the end of the culture process, 2 – CL after depth filtration (clarified), 3 – clarified CL with the addition of cysteine-containing buffer.

проб не представлялось возможным, так как степень их очистки была высокой и практически не различалась. На основании этих результатов мы не стали ни снижать значение pH, ни повышать уровень DO в КЖ, но при этом сразу после завершения процесса культивирования охлаждали КЖ до 10°C.

Ранее показано [9, 10], что внесение в КЖ цистеинсодержащего буфера приводило к стабилизации и увеличению выхода мономера. Однако ни эта процедура, ни введение перекиси водорода в КЖ не дали желаемого результата. Выход мономера и его стабильность практически не отличались в пробах с добавками от контрольных образцов.

На рис. 1 и 2 представлены результаты электрофоретического анализа (в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях соответственно)

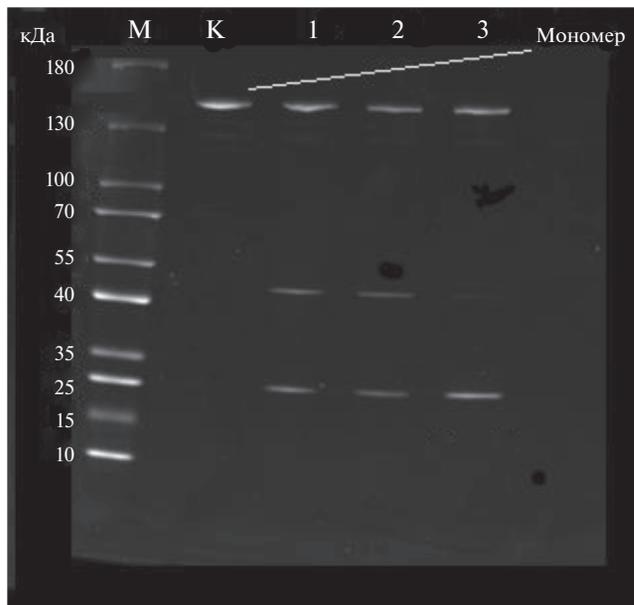


Рис. 2. Электрофоретический анализ образцов, полученных на стадиях выделения моноАТ бевацизумаб. Представлены результаты электрофореза в 12.5%-ном ПААГ (невосстанавливающие условия). На каждую дорожку нанесено 0.5 мкг общего белка. Обозначения те же, что на рис. 1.

Fig. 2. Electrophoretic analysis of samples obtained at the stages of bevacizumab isolation. The results of electrophoresis in 12.5% PAAG (non-reducing conditions) are presented. Each lane contains 0.5 μ g of total protein. The designations are the same as in Fig. 1.

образцов моноАТ бевацизумаб в ходе процедуры выделения. На рис. 1 видно, что при электрофоретическом разделении белков в восстанавливающих условиях мономер полностью восстановлен и моноАТ представлено в виде двух фрагментов – тяжелой и легкой цепи. Массы этих цепей соответствуют таковым для контрольного образца. При электрофорезе в невосстанавливающих условиях (рис. 2) размер мономера бевацизумаб также соответствует контрольной пробе.

Далее мы проанализировали влияние разной загруженности колонки с аффинным сорбентом на выход моноАТ на стадии его выделения из КЖ. Это связано с тем, что выход бевацизумаба в АФХ часто снижается от серии к серии, хотя все параметры процесса и сорбент остаются неизменными [20]. В эксперименте № 1, результаты которого представлены в табл. 2, мы оценили потери бевацизумаба после очистки его из КЖ методом глубинного фильтрования и АФХ. Как видно, после глубинной фильтрации выход целевого продукта составил 83.8%, что считается хорошим результатом. Полученный продукт дальше очищали с использованием АФХ. На этой стадии выход бевацизумаба составил всего 35.8%. Это очень низкое

Таблица 2. Выход бевацизумаба в эксперименте № 1
Table 2. Bevacizumab yield in experiment No. 1

Технологическая стадия	Масса целевого продукта, г		Выход, %
	до очистки	после очистки	
Глубинная фильтрация	217.6	182.4	83.8
АФХ	182.4	65.3	35.8

Таблица 3. Выход бевацизумаба в эксперименте № 2
Table 3. Bevacizumab yield in experiment No. 2

Технологическая стадия	Масса целевого продукта, г		Выход, %
	до очистки	после очистки	
Глубинная фильтрация	721.2	645.1	89.4
АФХ	645.1	450.9	69.9

Таблица 4. Содержание мономера бевацизумаб в элюатах АФХ

Table 4. Bevacizumab monomer content in affinity chromatography eluates

Элюат АФХ	Содержание мономера, %
Эксперимент № 1	97.44 ± 4.24
Эксперимент № 2	98.07 ± 5.21

значение, поэтому в следующем эксперименте мы увеличили белковую нагрузку на сорбент.

В эксперименте № 2, результаты которого представлены в табл. 3, на стадию глубинной фильтрации поступило в 3.3 раза больше целевого продукта, чем в эксперименте № 1 (721.2 г против 217.6 г). Выход бевацизумаба на этой стадии составил 89.4%, то есть не ниже, чем в эксперименте № 1. Зато после АФХ выход бевацизумаба почти в 2 раза превысил таковой в эксперименте № 1, составив 69.9%. Таким образом, предположение, что низкий выход белка на стадии АФХ связан с низкой нагрузкой на сорбент, подтвердилось. Возможно это объясняется, тем что современные сорбенты с А-белком разработаны специально для ВЖХ-варианта, более емкого и эффективного, чем классический вариант жидкостной хроматографии. По-видимому, для эффективной АФХ-очистки антител из КЖ с низким их содержанием необходимо подбирать специальные условия. Например, R. Nahn с соавт. [20] сообщили, что некоторые сорбенты проявляют высокое сродство к IgG, поэтому элюировать образец полностью не представляется возможным, а значит его выход снижается.

В табл. 4 приведены результаты анализа чистоты образцов мономера бевацизумаб после АФХ в экспериментах № 1 и № 2. Чистоту образцов мономера определяли методом капиллярного электрфореза.

Как можно заметить, процентное содержание мономера бевацизумаб высокое в обоих экспериментах.

На основании представленных результатов мы делаем следующие выводы. Опираясь на представленные в научной литературе данные о положительном влиянии на стабильность моноАТ низкого значения рН и высокого уровня DO в КЖ [17], мы исследовали эти параметры, но не получили статистически значимых отличий от контрольных образцов. Это же можно сказать и относительно добавления к КЖ цистеинсодержащего буфера и перекиси водорода.

Нами показано, что мономер в пробе из биореактора, не прошедший стадию глубинной фильтрации, полностью стабилен в течение 1 недели хранения при 2–6°C, в то время как после глубинной фильтрации и хранения в этих же условиях его содержание снижается на 9.2%. Также в ходе проведенных экспериментов установлено, что низкий выход белка на стадии АФХ может быть связан с низкой нагрузкой на сорбент. Уровень белковой нагрузки необходимо подбирать экспериментально с учетом типа сорбента и условий проведения АФХ.

Восстановление межцепочечных дисульфидных связей в молекулах антител — одна из проблем производства терапевтических моноАТ, поэтому исследование возможных путей предотвращения или ингибирования этих нежелательных реакций актуально на каждом этапе биотехнологического процесса.

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. Reichert J.M., Rosensweig C.J., Faden L.B., Dewitz M.C. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat. Biotechnol.*, 2005, 23(9), 1073–1078. <https://doi.org/10.1038/nbt0905-1073>
2. Rosen L.S. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control.*, 2002, 9(2_suppl.), 36–44. <https://doi.org/10.1177/107327480200902s05>
3. Kunert R., Reinhart D. Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, 100, 3451–3461. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7388-9>
4. O'Flaherty R., Bergin A., Flampouri E., Mota L.M., Obaidi I., Quigley A., Xie Y., Butler M. Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: a review of the critical steps in their biomanufacturing. *Biotechnol. Adv.*, 2020, 1, 107552. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107552>
5. Zhou J.X., Tressel T., Yang X., Seewoester T. Implementation of advanced technologies in commercial monoclonal antibody production. *Biotechnol. J.*, 2008, 3, 1185–1200. <https://doi.org/10.1002/biot.200800117>
6. Shukla A.A., Thömmes J. Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends Biotechnol.*, 2010, 28, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.02.001>
7. Liu H., Nowak C., Shao M., Ponniah G., Neill A. Impact of cell culture on recombinant monoclonal antibody product heterogeneity. *Biotechnol. Prog.*, 2016, 32, 1103–1112. <https://doi.org/10.1002/btpr.2327>
8. Ren T., Tan Z., Ehamparanathan V., Lewandowski A., Ghose S., Li Z.J. Antibody disulfide bond reduction and recovery during biopharmaceutical process development – a review. *Biotechnol. Bioeng.*, 2021, 118, 2829–2844. <https://doi.org/10.1002/bit.27790>
9. Trexler-Schmidt M., Sargis S., Chiu J., Sze-Khoo S., Mun M., Kao Y.H., Laird M.W. Identification and prevention of antibody disulfide bond reduction during cell culture manufacturing. *Biotechnol. Bioeng.*, 2010, 106(3), 452–461. <https://doi.org/10.1002/bit.22699>
10. Kao Y.H., Hewitt D.P., Trexler-Schmidt M., Laird M.W. Mechanism of antibody reduction in cell culture production processes. *Biotechnol. Bioeng.*, 2010, 107, 622–632. <https://doi.org/10.1002/bit.22848>
11. Derfus G.E., Dizon-Maspat J., Broddrick J.T., Velayo A.C., Toschi J.D., Santuray R.T., Hsu S.K., Winter C.M., Krishnan R., Amanullah A. Red colored IgG4 caused by vitamin B12 from cell culture media combined with disulfide reduction at harvest. *MAbs*, 2014, 6(3), 679–688. <https://doi.org/10.4161/mabs.28257>
12. Chung W.K., Russell B., Yang Y., Handlogten M., Hudak S., Cao M., Wang J., Robbins D., Ahuja S., Zhu M. Effects of antibody disulfide bond reduction on purification process performance and final drug substance stability. *Biotechnol. Bioeng.*, 2017, 114, 1264–1274. <https://doi.org/10.1002/bit.26265>
13. Koterba K.L., Borgschulte T., Laird M.W. Thioredoxin 1 is responsible for antibody disulfide reduction in CHO cell culture. *J. Biotechnol.*, 2012, 157, 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.11.009>
14. Handlogten M.W., Zhu M., Ahuja S. Glutathione and thioredoxin systems contribute to recombinant monoclonal antibody interchain disulfide bond reduction during bioprocessing. *Biotechnol. Bioeng.*, 2017, 114, 1469–1477. <https://doi.org/10.1002/bit.26278>
15. O'Mara B., Gao Z.H., Kuruganti M., Mallett R., Nayar G., Smith L., Meyer J.D., Therriault J., Miller C., Cisney J., Fann J. Impact of depth filtration on disulfide bond reduction during downstream processing of monoclonal antibodies from CHO cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 2019, 116, 1669–1683. <https://doi.org/10.1002/bit.26964>
16. Wang J., Ahuja S. Online control of cell culture redox potential prevents antibody interchain disulfide bond reduction. *Biotechnol. Bioeng.*, 2020, 117, 1329–1336. <https://doi.org/10.1002/bit.27281>
17. Mullan B., Dravis B., Lim A., Clarke A., Janes S., Lambooy P., Olson D., O'Riordan T., Ricart B., Tulloch A.G. Disulphide bond reduction of a therapeutic monoclonal antibody during cell culture manufacturing operations. *BMC Proc.*, 2011, 5(Suppl. 8), P110. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-5-S8-P110>
18. Mun M., Khoo S., Do M.A., Dvornicky J., Trexler-Schmidt M., Kao Y.H., Laird M.W. Air sparging for prevention of antibody disulfide bond reduction in harvested CHO cell culture fluid. *Biotechnol. Bioeng.*, 2015, 112, 734–742. <https://doi.org/10.1002/bit.25495>
19. Du C., Huang Y., Borwankar A., Tan Z., Cura A., Yee J.C., Singh N., Ludwig R., Borys M., Ghose S., Mussa N., Li Z.J. Using hydrogen peroxide to prevent antibody disulfide bond reduction during manufacturing process. *MAbs*, 2018, 10(3), 500–510. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1424609>
20. Hahn R., Schlegel R., Jungbauer A. Comparison of protein A affinity sorbents. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2003, 790, 35–51. [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(03\)00092-8](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(03)00092-8)

Effect of Isolation and Purification Conditions on the Yield of Bevacizumab Monomer

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

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

^b*Rostov Plant of Active Pharmaceutical Ingredients, Rostov, Yaroslavl oblast, 152150 Russia*

^c*LLC "Sputnik Technopolis", Moscow, 109316 Russia*

^d*FDF and Biotechnological Substances Plant, Yaroslavl, 150061 Russia*

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

Abstract—The stability of monoclonal antibody (mAb) monomer after the end of cultivation is one of the key tasks in the production of this type of biotechnological products. The fact is that in the purification of the culture liquid (CL) of mAb-producing cells and its storage between purification steps, it is impossible to avoid the influence of a number of factors that can be destructive for monomeric target molecules. The effect of CL storage conditions after completion of the cultivation process, as well as the addition of hydrogen peroxide and cysteine-containing buffer, on the yield and stability of bevacizumab monomer was investigated. It was found that the yield of the mAb after depth filtration from CL collected on the last day of cultivation was $88.9 \pm 4.33\%$, whereas that from CL stored in the dark at $2-6^\circ\text{C}$ for 1 week decreased to $74.0 \pm 3.84\%$. Reducing the pH to 6.6 ± 0.1 and increasing the dissolved oxygen level to $60 \pm 10\%$ in the CL, both collected immediately after the end of cultivation and after storage, did not affect the mAb yield. We also found that the low protein yield at the affinity chromatography stage may be due to low sorbent loading. The protein loading should be selected experimentally, taking into account the type of sorbent and chromatography conditions.

Keywords: monoclonal antibodies, bevacizumab, stability, depth filtration, affinity chromatography, capillary electrophoresis