

РАЗРАБОТКА МАСШТАБИРУЕМОГО ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ АНТИГЕНА «с» СИСТЕМЫ РЕЗУС

В.С. Горелова, М.Л. Машкова, Н.И. Оловникова, Т.Л. Николаева

ООО «Гематолог», Москва, Россия

Введение

Своевременная гемотрансфузия сохраняет значительное количество жизней пациентов. Ежегодно в России производится порядка 3,8 миллиона процедур, а общий объем сданной донорской крови и ее компонентов в 2025 году оценивается более чем в 600 000 литров за первые три месяца года, что экстраполирует к примерно 2,4 миллиона литров за год [1]. Иммунологическую безопасность переливания крови обеспечивает фенотипирование антигенов эритроцитов реципиентов и доноров. Из существующих 48 (по состоянию на май текущего года) систем групп крови человека наибольшее число осложнений, связанных с трансфузией, приходится на систему Резус. Обусловлено это иммуногенностью, то есть способностью вызывать иммунный ответ у лиц, отрицательных по одному из антигенов. Одними из наиболее опасных иммунных антител являются антитела к антигену «с». Аллоиммунные анти-с антитела способны вызывать серьезные посттрансфузионные реакции, а также гемолитическую болезнь новорожденных [2]. Для выявления антигена «с» необходим реагент анти-с, производимый в настоящее время несколькими зарубежными биотехнологическими компаниями (Millipore (США) и Diagast (Франция)).

Компания «Гематолог», где проводилось исследование, специализируется на производстве моноклональных реагентов для трансфузиологии. Реагенты создаются на основе собственных клеточных линий-продуцентов, полученных с помощью гибридной технологии. Одним из новых направлений работы компании стало производство рекомбинантных антител.

Рекомбинантные антитела класса IgG нашли широкое применение в терапии, в то время как IgM имеют преимущества как основа типизирующих реагентов благодаря способности вызывать прямую агглютинацию [3]. Получение антител класса IgM остаётся технически сложной задачей из-за их большой мультивалентной структуры и необходимости правильного формирования дисульфидных связей и посттрансляционных модификаций, обеспечивающих стабильность и функциональность молекул [4]. В ООО «Гематолог» был получен продуцент антител класса IgM человека против антигена «с» системы Резус на основе сублинии НЕК293F. Преимуществом выбранной клеточной линии является адаптивность к суспензионным условиям роста, в отличие от родительской НЕК293, и как следствие, упрощение масштабирования процесса культивирования.

Обязательным этапом для промышленного использования рекомбинантного антитела против антигена «с» системы Резус является оптимизация и масштабирование культивирования линии-продуцента. В данной работе представлены результаты по подбору питательной среды и условий культивирования для высокой продукции антител в колбах Эрленмейера и в лабораторном реакторе с волновым типом перемешивания (10л).

Материалы и методы

Объектом исследования является стабильный продуцент рекомбинантных IgM антител против антигена «с» системы Резус на основе клеточной линии НЕК293F.

Культивирование проводили на средах: HyClone™ CDM4НЕК293 (Cytiva, США), H715 CD 293Pro (BasalMedia, Китай), EmCD НЕК293 Plus (Eminence, Китай), НЕК293 CDM26 (Tofflon, Китай), НЕК293 CDM26 Pro (Tofflon, Китай), OptiVibro (ExCell, Китай), ГибриС-1-293 (ПанЭко, Россия). Во все питательные среды добавляли смесь пенициллина (100 МЕ/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл), а в случае отсутствия глутамин в среде, вносили раствор L-глутамин в концентрации 4-6 мМ в зависимости от рекомендаций производителя.

Культуру клеток выращивали в колбах Эрленмейера с вентилируемыми крышками объемом 125 мл – 35 мл, 1000 мл – 330 мл и 3000 мл – 1000 мл (Fudau, Китай) на орбитальном шейкере при 110 об/мин и амплитуде 25 мм, 37 °С и 5 % CO₂. Далее культивировали в волновом биореакторе LePhenix

с максимальным рабочим объемом 10л (Leruge, Китай). Оптимальные параметры для культивирования в волновом реакторе, основываясь на инструкции от производителя, представлены в Таблице 1 [5]. Концентрацию и жизнеспособность клеток определяли методом окрашивания 0,4% раствором трипанового синего и ручным подсчетом с помощью камеры Горяева [6]. Относительное содержание антител определяли по их титру в реакции прямой агглютинации с эритроцитами с фенотипом «Сс» в серии двукратных разведений в круглодонной микроплате, где результат оценивают по рисунку осадка эритроцитов после инкубации. За титр принимают последнее разведение, вызывающее агглютинацию эритроцитов [7]. В качестве контрольного образца выступал реагент анти-с 953 (Diagast, Франция).

Таблица 1 – Рекомендуемые параметры для культивирования в биореакторе LePhinix

Параметр	Температура, °С	Растворенный кислород (DO), %	pH	CO2 в газовой смеси, %	Скорость перемешивания, кач/мин	Объемный расход газовой смеси, л/мин	Угол, °
Значение	+37±1	40-50	7,0±0,1	5±1	15-20	0,1-0,2	6-8

Подбор питательной среды проводили в колбах 125 мл с рабочим объемом 35 мл с начальной клеточной плотностью $0,3 \cdot 10^6$ клеток/мл. Адаптация клеточной линии к тестируемым средам осуществлялась в три последовательных пассажа, пассировали культуру раз в 3-4 дня. Далее культивировали клетки на каждой из сред в трех повторениях в течение 9 суток, определяли титр антител и строили кривую роста. Последующие эксперименты с подбором оптимальных параметров в колбах большего объема и в биореакторе проводили на среде H715 CD 293Pro.

Результаты исследований

На рынке представлено большое количество коммерческих сред, свойства которых направлены на различные назначения, например, для роста культуры при временной или стабильной трансфекции, для наработки антител или для продукции вирусов. Оценка влияния питательных сред в текущей работе ориентирована на поиск состава, способствующего достижению высокого выхода моноклональных антител, сохранению высокой доли жизнеспособных клеток в течение продолжительного времени и возможности масштабирования в полунепрерывном процессе.

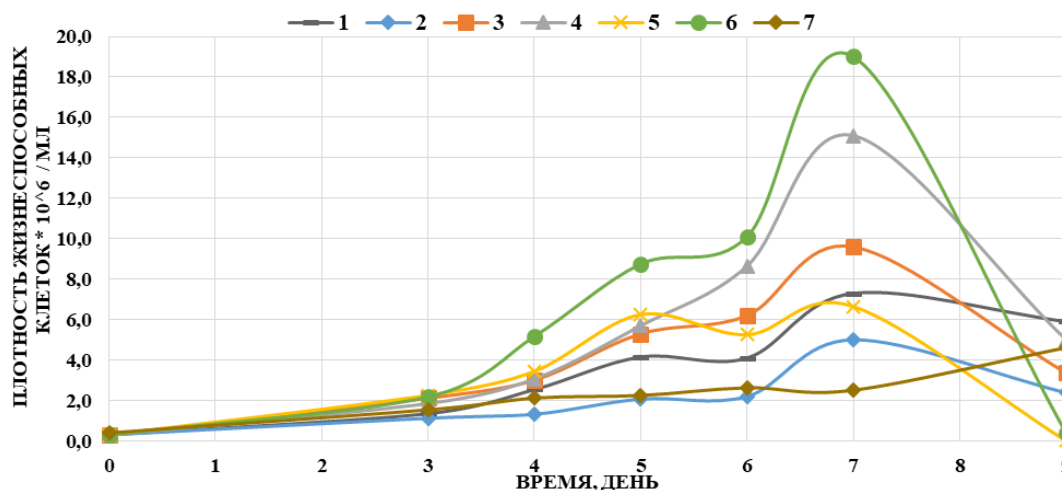


Рисунок 1. Динамика роста анти-с продуцента на тестируемых средах (1 – CDM26, Tofflon; 2 – ГибриС, ПанЭко; 3 – HyClone, Cytiva, 4 – H715, BasalMedia; 5 – EmCD, Eminence; 6 – CDM26Pro, Tofflon; 7 – OptiVibro, ExCell)

Анализируя динамику роста клеточной линии-продуцента на тестируемых средах, наблюдается устойчивый прирост клеточной массы до 7 дня, после чего наступает фаза гибели клеток, кроме варианта на среде OptiVibro (7), где продолжает увеличиваться клеточная плотность и снижаться жизнеспособность (Рисунок 1, 2). В меньшей степени выражен прирост при культивировании на средах 1, 2, 5 (рис. 1). Пик существенно превышает значения, наблюдаемые в остальных пробах, на средах CDM26Pro (6) – $19 \cdot 10^6$ клеток/мл 82%, H715 (4) – $15,1 \cdot 10^6$ клеток/мл 87 и HyClone (3) – $9,6 \cdot 10^6$ клеток/мл 80%.

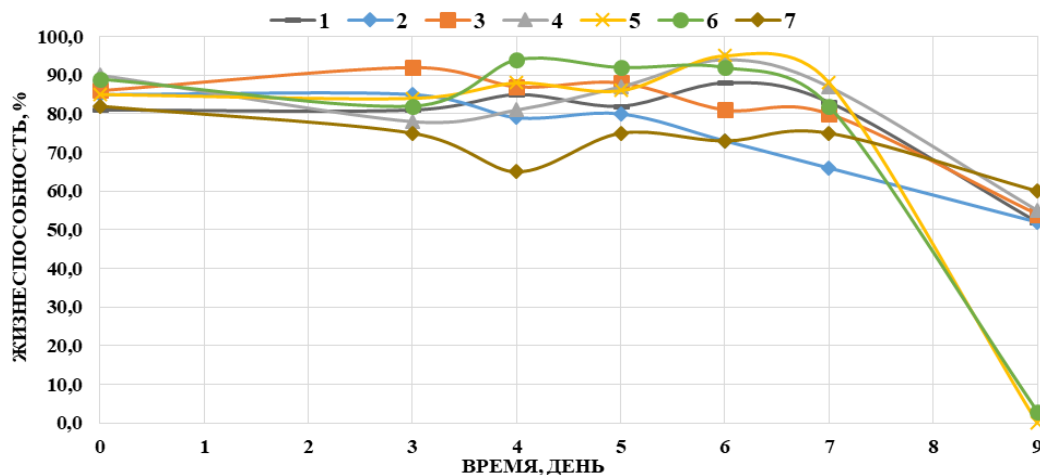


Рисунок 2. Изменение жизнеспособности анти-с продуцента на тестируемых средах (1 – CDM26, Tofflon; 2 – ГибриС, ПанЭко; 3 – HyClone, Cytiva; 4 – H715, BasalMedia; 5 – EmCD, Eminence; 6 – CDM26Pro, Tofflon; 7 – OptiVibro, ExCell)

В период адаптации культуры клеток (до 3-х суток) жизнеспособность на всех вариантах превышает 75%, посадочные значения выше 80%. Большинство сред способствуют поддержанию или увеличению жизнеспособности клеток. Однако стабильное снижение показателей отмечаются на 2, 3 и 7 средах (рис. 2). Жизнеспособность более 90% достигается на вариантах: H715 (4) – 94%, EmCD (5) – 95% и CDM26Pro (6) – 92%. После 6 суток отмечается характерное отмирание клеток, в особенности на средах 5 и 6.

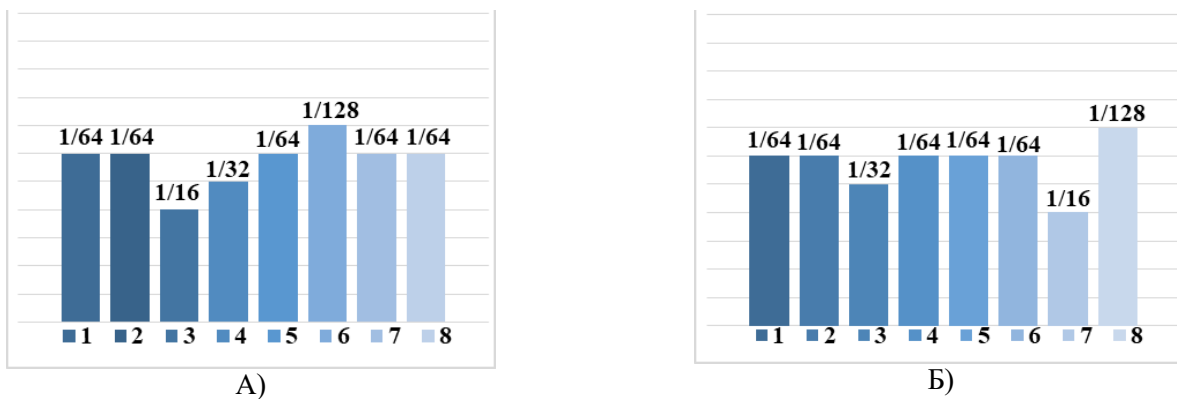


Рисунок 3. А. Титр антител на 7 сутки; Б. Титр антител на 9 сутки (1 – контроль 1:10 Diagast; 2 – H715, BasalMedia; 3 – ГибриС, ПанЭко; 4 – HyClone, Cytiva; 5 – CDM26, Tofflon; 6 – CDM26Pro, Tofflon; 7 – EmCD, Eminence; 8 – OptiVibro, ExCell)

Титр моноклональных анти-с антител оценивается на 7 и 9 сутки периодического культивирования, что является оптимальным временем для продукции максимального количества антител. Тестирование питательных сред на выход целевого продукта доказывает, что в некоторых случаях необходимо большее количество дней для достижения контрольных значений. Например, на среде HyClone (4) на 7 сутки титр ниже и на 9 сутки равен контролю, аналогичный эффект наблюдался на среде OptiVibro (8), но превышающий контрольное значение на 9 сутки (рис. 3). Вариант 3 не соответствовал установленным стандартам. Снижение титра антител после достижения максимума отмечается на средах 6 и 7, где особое влияние оказывает гибель клеток и, вероятно, накопление протеаз, ускоряющих деградацию уже продуцированных антител [8].

По совокупности исследованных показателей наилучшие результаты, необходимые для процесса масштабирования, были достигнуты на средах CDM26 и H715. Питательная среда CDM26Pro также является хорошей основой, но для периодического культивирования.

Последующее масштабирование в колбы большего объема проводилось в аналогичных условиях на среде H715 с начальной клеточной плотностью $0,4-0,5 \cdot 10^6$ клеток/мл с заполняемостью колб 30-40% от общего объема. Далее культуру переносили в биореактор с конечным рабочим объемом 10 л, где оптимальные параметры роста достигались с помощью каскадного типа регулирования, то есть

автоматически, с помощью подачи газов и изменения скорости перемешивания. На рисунке 4 представлена динамика роста клеток-продуцента при полунепрерывном (отъёмно-доливном) культивировании, которое предполагает отбор части культуральной жидкости и добавление свежей питательной среды с целью снижения эффекта ингибирования метаболитами и недостатком субстрата, в течение 45 суток.

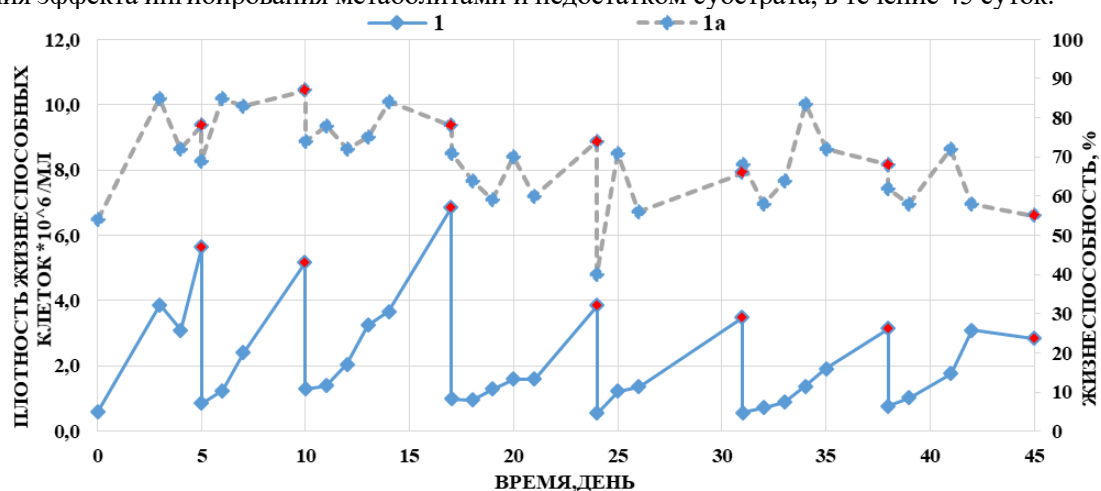


Рисунок 4. Полунепрерывное культивирование продуцента анти-с в волновом биореакторе (1 – динамика клеточного роста, 1a – жизнеспособность)

При подборе оптимальных условий важно определить границы значений, при которых наблюдаются устойчивые рост и продукция антител. Начальную клеточную плотность варьировали от $0,5$ до $1,3 \cdot 10^6$ клеток/мл, цикл культивирования составлял 5 и 7 суток. Конечный титр антител при двух циклах не отличался от контрольных значений. При 5-дневном росте наблюдали повышение жизнеспособности и высокую клеточную плотность культуры, так как пассирование проводилось в период активного роста. Цикл в 7 суток способствовал замедлению роста и снижению жизнеспособности, а также накоплению дебриса на стенках культуральной ёмкости. С увеличением начальной клеточной плотности титр антител на выходе не отличался от других циклов, максимальное значение роста также значительно не увеличивалось.

Заключение:

Произведена работа по масштабированию, подбору питательных сред и оптимальных параметров культивирования продуцента рекомбинантных IgM антител человека против антигена «с» системы Резус на основе клеточной линии HEK293F. Оценка широкого спектра питательных сред показала, что среды CDM26 (Tofflon) и H715(BasalMedia) соответствуют установленным требованиям. По масштабированию процесса для данной культуры были определены оптимальные условия культивирования в лабораторном волновом биореакторе LePhenix с рабочим объёмом 10 л. Культивирование проводили отъёмно-доливным методом, оптимальным временем сбора культуральной жидкости был 5-й день, а оптимальная начальная клеточная плотность составила $0,5 \cdot 10^6$ клеток/мл. Подобранные значения позволяют длительно поддерживать высокоплотную культуру в активном состоянии в каждом цикле культивирования, а также стабильно получать высокий выход целевого продукта.

Литература

1. РИА Новости. URL: <https://ria.ru/20250420/donory-2012341576.html> (дата обращения: 23.04.2025).
2. Hassan M.N., Mohd Noor N.H., Johan Noor S.R. et al. Hemolytic disease of fetus and newborn due to maternal red blood cell alloantibodies in the Malay population // Asian Journal of Transfusion Science. 2014. Vol. 8. № 2. P. 113–117.
3. Buchner J., Sitia R., Svilenov H.L. Understanding IgM Structure and Biology to Engineer New Antibody Therapeutics // BioDrugs. 2025. Vol. 39. № 1. P. 1–11. doi: 10.1007/s40259-024-00673-2
4. Эршлер М.А., Оловникова Н.И. Продукция моноклональных антител класса IgM в клетках DG44 // Биотехнология. 2014. № 2. С. 24–34.
5. Arena T.A., Chou B., Harms P.D., Wong A.W. An anti-apoptotic HEK293 cell line provides a robust and high titer platform for transient protein expression in bioreactors // mAbs. 2019. Vol. 11. № 5. P. 977–986.
6. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Общая фармакопейная статья «Определение концентрации микробных клеток» (ОФС.1.7.3.0020). М.: Минздрав России, 2018.
7. Marsh W.L. Serum-free cell culture // Transfusion. 1972. Vol. 12. № 5. P. 352–353.
8. Cai Z., Zhang A., Choksi S. et al. Activation of cell-surface proteases promotes necroptosis, inflammation and cell migration // Cell Research. 2016. Vol. 26. № 8. P. 886–900.