

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-89

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДОБАВОК НА СИАЛИРОВАНИЕ ДАРБЭПОЭТИНА-АЛЬФА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ПРОДУЦЕНТА НА ОСНОВЕ CHO В РЕЖИМЕ FED-BATCH

### STUDY OF THE EFFECT OF ADDITIVES ON THE SIALYLATION OF DARBEPOETIN-ALFA IN CHO-BASED CULTIVATION IN FED-BATCH MODE

Е. М. Миронова, Е. А. Пономаренко, А. К. Белов, А. О. Грюк, Р. А. Марьгин, Е. В. Воронина, Ю. А. Серегин

ООО «ФАРМАПАРК», Москва

E. M. Mironova, E. A. Ponomarenko, A. K. Belov, A. O. Gryuk, R. A. Marygin, E. V. Voronina, Y. A. Seregin

PHARMAPARK, LLC, Moscow

✉ e.mironova@pharmapark.ru

#### Аннотация

В рамках представленной работы показано эффективное использование сочетания добавок N-ацетил-D-маннозамина, бутирата натрия и галактозы в ходе культивирования клеток CHO, продуцирующих дарбэпоэтин-альфа, для увеличения выхода высокосиалированных форм.

#### Abstract

Within the presented study, a combination of N-acetyl-D-mannosamine, sodium butyrate, and galactose additives was showed for use during the cultivation of CHO cells producing darbepoetin alfa. The addition of these chemicals enabled an increase in the yield of highly sialylated forms of darbepoetin alfa.

#### Материалы и методы

Для культивирования использовали продуцент на основе суспензионной линии CHO. Культивирование осуществляли в режиме fed-batch на среде PowerCHO-2CD (Lonza, Швейцария) с ежедневным внесением подпитки EX-CELL Advanced CHO Feed 1 (Merck, США). Анализ концентрации проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, анализ гликанов и степени сиалирования — с помощью нормально-фазовой ВЭЖХ с флуоресцентной меткой.

#### Результаты

В рамках исследования параметров качества было подтверждено, что при культивировании продуцента на основе CHO образуются 22 заряженные изоформы, из которых в финальном полупродукте после очистки остаются 6 изоформ, с наибольшей степенью сиалирования.

В связи с этим для достижения биоподобия дарбэпоэтина в сравнении с оригинальным препаратом «Аранесп» была предложена оптимизация профиля гликозилирования, направленная на увеличение выхода высокосиалированных форм при уменьшении доли гликанов с низкой степенью разветвленности, а также асиалированных, моно- и дисиалированных.

Для выполнения поставленной задачи было решено добавлять N-ацетил-D-маннозамин при культивировании, как предшественника сиаловых кислот. Показано, что его внесение в концентрации до 40 мМ приводило к незначительному увеличению выхода высокосиалированных форм дарбэпоэтина. Повышение концентрации до 100 мМ негативно влияло на жизнеспособность продуцента и его культуральные характеристики, при этом увеличения степени сиалирования не наблюдалось.

Сочетание N-ацетил-D-маннозамина (40 мМ) и бутирата натрия (0,3 мМ) оказалось эффективнее, чем использование только предшественника сиаловых кислот, но недостаточным для достижения биоподобия.

В результате исследования влияния постепенного снижения температуры культивирования с 37 до 30 °C было показано, что доля гликанов с высокой степенью разветвленности увеличивается. Однако при одновременном изменении температуры культивирования и использовании вышеупомянутых добавок желаемого биоподобия достичь не удавалось.

Для решения проблемы было предложено дополнительно внести галактозу в качестве субстрата для обеспечения эффективного процессинга разветвленных гликанов, содержащих сиаловые кислоты на конце.

Таким образом, сочетание галактозы в минимально эффективной концентрации 30 мМ с N-ацетил-D-маннозамином (40 мМ) и бутиратом натрия (0,3 мМ) способствовало повышению доли гликанов с высокой степенью разветвленности и сиалирования более чем в 3 раза, что позволило увеличить выход целевых изоформ белка после очистки и достичь биоподобия в пределах изменчивости оригинального препарата «Аранесп».