

ИЗМЕНЕНИЕ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА ПОДКЛАССА IgG1 ЗА СЧЕТ ПОДБОРА УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ И ДОБАВОК

С.С. Тимонова^{1,*}, А.А. Полупанова¹, И.А. Кирик¹, О.А. Карпунина¹, А.А. Федоров¹, Е.В. Зубарева¹, В.В. Мягкова², А.А. Пискунов¹, Р.А. Хамитов¹

¹ АО «ГЕНЕРИУМ»

601125, Российская Федерация, Владимирская обл., Петушинский р-н, п. Вольгинский, ул. Владимирская, 14

² Eminence Scientific (Suzhou) Co., Ltd.

Китай, Цзянсу, Промышленный парк Сучжоу, ул. Сантянь, 218, 3F, 24

Возможность изменения профиля гликозилирования — важная опция при разработке технологии получения терапевтических рекомбинантных иммуноглобулинов. Гликаны обеспечивают влияние на различные эффекторные функции антитела, такие как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), комплементзависимая цитотоксичность (CDC) и период полувыведения препарата. Способность достигнуть необходимого гликопрофиля терапевтического антитела за счет оптимизации условий культивирования будет способствовать как получению более эффективных препаратов, так и ускоренной разработке биоаналогов. По результатам проведенной работы установлено, что увеличение длительности культивирования приводит к снижению содержания галактоз, добавление регулятора афукоз EM-N-glycan regulator-2 (“Eminence”, Китай) приводит к увеличению афукозилированных гликанов; коэкспрессия фермента Fut8 приводит к увеличению маннозных остатков. Также были апробированы различные подходы, обеспечивающие регуляцию содержания фукоз, манноз и галактоз в ходе процесса биосинтеза терапевтического антитела IgG1.

Ключевые слова: культура клеток CHO, профиль гликозилирования, рекомбинантные белки, терапевтические антитела

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работы финансированы АО «ГЕНЕРИУМ».

Благодарности: авторы выражают благодарность компании “Eminence” за предоставление регулятора афукоз EM-N-glycan regulator-2 (Китай), а также лично руководителю российского представительства “Eminence” Шестакову Сергею Анатольевичу и специалисту по развитию бизнеса и маркетингу Беззаботновой Наталии Юрьевне за помощь и содействие в проведении исследования.

Для цитирования: Тимонова С.С., Полупанова А.А., Кирик И.А., Карпунина О.А., Федоров А.А., Зубарева Е.В., Мягкова В.В., Пискунов А.А., Хамитов Р.А. Изменение гликозилирования рекомбинантного иммуноглобулина человека подкласса IgG1 за счет подбора условий культивирования продуцентов и добавок. *Биомедицина*. 2025;21(2):37–48. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-2-37-48>

Поступила 03.03.2025

Принята после доработки 23.04.2025

Опубликована 10.06.2025

ALTERED GLYCOSYLATION OF SUBCLASS IgG1 RECOMBINANT HUMAN IMMUNOGLOBULIN BY SELECTING CULTURE CONDITIONS FOR PRODUCERS AND ADDITIVES

Sofia S. Timonova^{1,*}, Anna A. Polupanova¹, Inessa A. Kirik¹, Olga A. Karpunina¹,
Alexander A. Fedorov¹, Ekaterina V. Zubareva¹, Vera V. Myagkova²,
Alexander A. Piskunov¹, Ravil A. Khamitov¹

¹ GENERIUM

601125, Russian Federation, Vladimir Region, Petushinsky District, Volginsky Settlement, Vladimirsкая Str., 14

² Eminence Scientific (Suzhou) Co., Ltd.

China, Jiangsu, Suzhou Industrial Park, Sangtian Str., 218, 3F, 24

The possibility to alter the glycosylation profile is an important prerequisite for the development of production technologies of therapeutic recombinant immunoglobulins. Glycans affect various effector functions of the antibody, such as antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), complement-dependent cytotoxicity (CDC), and the drug half-life. The possibility to achieve the required glycosylation profile of a therapeutic antibody by optimizing cultivation conditions will facilitate both the creation of more effective drugs and accelerated development of biosimilars. The conducted study found that an increase in the cultivation duration leads to a decrease in the galactose content. The addition of the EM-N-glycan regulator-2 afucose regulator (Eminence, China) led to an increase in the content of afucosylated glycans. The co-expression of the Fut8 enzyme led to an increase in mannose residues. Various approaches to regulation of fucose, mannose, and galactose contents during biosynthesis of IgG1 therapeutic antibody were tested.

Keywords: CHO cell culture, glycosylation profile, recombinant proteins, therapeutic antibodies

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the work was funded by GENERIUM.

Acknowledgments: the authors express their gratitude to “Eminence” for providing the afucose regulator EM-N-glycan regulator-2 (China), and also express their personal gratitude to Sergey Anatolievich Shestakov, Head of the Russian representative office of “Eminence”, and Natalia Yurievna Bezzabotnova, Business Development and Marketing Specialist, for their help and assistance in conducting the study.

For citation: Timonova S.S., Polupanova A.A., Kirik I.A., Karpunina O.A., Fedorov A.A., Zubareva E.V., Myagkova V.V., Piskunov A.A., Khamitov R.A. Altered Glycosylation of Subclass IgG1 Recombinant Human Immunoglobulin by Selecting Culture Conditions for Producers and Additives. *Journal Biomed.* 2025;21(2):37–48. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-2-37-48>

Submitted 03.03.2025

Revised 23.04.2025

Published 10.06.2025

Введение

Среди всех одобренных препаратов на основе рекомбинантных белков более 40% представлены иммуноглобулинами класса G, что подчеркивает важность понимания механизма гликозилирования и изучения способов его контроля и регулирования во время разработки лекарств подобного типа [6].

Гликозилирование представляет собой одну из наиболее распространенных форм посттрансляционной модификации белка, протекающую в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) и аппарате Гольджи клетки, где в результате каскада многоступенчатых реакций с участием различных ферментов происходит образование ковалентной связи между полисахаридной цепью и аминокислотой [17].

Выделяют три основных типа гликозилирования белка, среди которых N-связанное гликозилирование свойственно антителам и способно определять их эффекторную функцию и фармакокинетику [9], а именно ADCC, CDC и время полувыведения препарата [15]. Таким образом, N-гликозилирование терапевтических антител является важным атрибутом качества будущего препарата.

Наличие или отсутствие различных гликоформ определяет функции терапевтического антитела. Так, например, было показано, что снижение уровня фукозилирования IgG усиливает ADCC [12]. С галактозилированными формами обычно связывают наличие у антител способности к стимулированию CDC [5, 21]. Высокоманнозные олигосахариды потенциально могут повлиять на время циркуляции антитела [8]. Так, антитела с высоким уровнем манноз (структуры Man5 и выше) выводятся из кровотока быстрее, чем антитела со зрелыми олигосахаридами сложного типа, что имеет прямое отношение к терапевтической эффективности [11]. Содержание сиалирированных гликанов у IgG, получаемых с использованием клеток млекопитающих, в большинстве случаев низкое и имеет низкое влияние на иммуногенность и фармакокинетику [19].

Профиль гликозилирования терапевтических белков и его углеводный состав определяются различными факторами: родительской клеточной линией, условиями культивирования продуцента [16], уровнем экспрессии основных генов ферментов, участвующих в биосинтезе гликанов [2]. Существуют различные подходы для регулирования гликопрофиля IgG:

• **Состав ростовых сред, добавок, регуляторов, ионов металлов**

Состав культуральной среды является одним из критических факторов, который определяет гликопрофиль антитела. В результате экспериментов на примере клеточных линий CHO, экспрессирующих

моноклональные IgG1, было установлено влияние различных добавок на профиль гликозилирования:

✓ добавление глюкозамина в ростовую среду приводит к снижению галактозилирования и увеличению относительного содержания фукозилированных гликоформ без концевых остатков галактозы; добавление сульфата меди — к уменьшению количества высокоманнозных гликанов (Man5); добавление уридина приводит к увеличению всех галактозилированных гликоформ и уменьшает количество G0, G0F и Man5; добавление фукозы приводит к уменьшению количества высокоманнозных гликанов и увеличивает G1F [11];

✓ добавление галактозы повышает уровень галактозилированных форм [7];

✓ добавление сульфата меди приводит к увеличению относительного содержания фукозилированных гликоформ без концевых остатков галактозы [13];

✓ добавление ионов цинка — к снижению галактозилирования [22].

• **Условия культивирования: температурный режим, pH, осмоляльность**

Показано, что использование температурного режима со снижением до 33°C в присутствии глюкозамина приводит к изменению гликанового профиля рекомбинантных моноклональных антител [1]; добавление галактозы при определенной осмоляльности и завершении процесса культивирования при жизнеспособности культуры около 50% будет способствовать получению IgG с повышенным содержанием афукозилированных гликанов [14].

• **Нокаут генов ферментов, вовлеченных в биосинтез гликанов**

Гликозилтрансферазы — ферменты, непосредственно участвующие в биосинтезе N-гликанов иммуноглобулинов. Например, альфа-(1,6)-фукозилтрансфераза (alpha(1,6) FT, ген *Fut8*, EC 2.4.1.68) катализирует присоединение фукозы в альфа-1-6 связи к первому остатку GlcNAc, следующему

за пептидными цепями в N-гликанах, и тем самым отвечает за фукозилирование остова N-гликанов иммуноглобулина в клетках млекопитающих. Так, в работах исследователей разных групп показано, что клетки линии CHO, нокаутированные по *Fut8*, могут быть использованы для получения афукозилированных антител [20], которые обладают высокой активностью ADCC и эффективностью [4].

• **Снижение активности ферментов, участвующих в биосинтезе отдельных гликанов**

Изменение количества отдельных гликанов можно контролировать с помощью компонентов, подавляющих активность фермента, вовлеченного в биосинтез конкретного гликана. Так, например, было показано, что фукозилирование антитела IgG1 можно снизить с помощью добавления дезоксиманноджиримицина (DMJ), ингибитора лизосомальной α -маннозидазы (ЕС 3.2.1.24), при одновременном повышении уровня манноз [18].

Гликоинженерия и исследование влияния отдельных гликанов на функциональность антитела широко изучаются для улучшения качества биотерапевтических препаратов на основе рекомбинантных белков.

Цель работы — проведение ряда экспериментов по культивированию продуцентов IgG1 для изучения факторов, влияющих на регулирование гликанов: использование разных клеточных линий, коэкспрессии фермента *Fut8*, добавления коммерческого регулятора, а также длительности культивирования продуцента иммуноглобулина IgG1.

Материалы и методы

Плазмиды, кодирующие IgG1

Синтетические кодон-оптимизированные для экспрессии в клетках CHO гены *IgG1* (кодирующая нуклеотидная последовательность с фланкирующими сайтами рестрик-

ции) были клонированы в экспрессионные векторы с разными селективными маркерами. Экспрессия генов легкой и тяжелой цепей находилась под контролем промотора цитомегаловируса человека (CMV). Пример экспрессионных векторов представлен в статье, опубликованной авторами ранее [3]. В данной работе использовали аналогичные экспрессионные конструкции с генами *IgG1* легкой и тяжелой цепей антитела человека.

Суспензионное культивирование клеток CHO

Клетки CHO-K1, CHO-S, CHO-GS (ауксотрофы по глутамину) адаптировали к росту в бессывороточной среде BalanCD Growth A (“FUJIFILM Irvine Scientific”, США) и культивировали при условиях: 37°C, 5% CO₂, влажность более 70% в шейкер-инкубаторе Climo-Shaker ISF1-XC (“Kuhner”, Швейцария).

Расчет ростовых характеристик клеточных культур

Концентрацию жизнеспособных клеток и жизнеспособность культуры определяли с помощью автоматического счетчика клеток Countess II FL Automated Cell Counter (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Транфекция клеток CHO методом электропорации

Клетки CHO трансфицировали плазмидами, несущими гены *IgG1* легкой и тяжелой цепей антитела, на системе MaxCyte STX (“MaxCyte”, США) согласно инструкции прибора.

Получение продуцентов, экспрессирующих IgG1

Трансфицированные клетки высевали в плоскодонные 96-луночные планшеты в селективную среду. Затем проводили скрининг культуральной жидкости (КЖ) по продуктивности из 96-луночных планшетов, после чего продуценты с высоким титром переводили в 6-луночные планшеты. Далее проводили скрининг 6-луночных планшетов и переводили продуценты

с максимальной продуктивностью в мини-биореакторы.

Иммуноферментный анализ

Для определения концентрации IgG1 проводили ИФА в 96-луночных планшетах MaxiSorp (“Thermo Scientific Nunc”, Дания). Использовали сорбирующие антитела I1886 (“Sigma”, США). В качестве детектирующих антител использовали ab8667 (HRP, “Sigma”, США). В качестве стандарта применяли рекомбинантный человеческий IgG1 (“Abcam”, США, ab155632). Измерения проводили на спектрофотометре Synergy LX при 450 нм (“BioTek Instruments Inc.”, США).

Культивирование продуцентов с подпиткой проводили в мини-биореакторах (“Techno Plastic Products AG”, Швейцария) в 20 мл питательной среды BCD, 5% CO₂, 37°C. Для культивирования продуцентов использовали шейкер-инкубатор Climo-Shaker ISF1-XC (“Kuhner”, Швейцария), 200 об/мин. В качестве регулятора афукоз добавляли EM-N-glycan regulator-2 (“Eminence”, Китай, cat: 240304.0010) 1-3% от объема культивирования, однократно в первые сутки.

Хроматографическая очистка IgG1

Для очистки IgG1 использовали сорбент MabSelect SuRe (“Cytiva”, Швеция). КЖ с целевым белком наносили на колонку, предварительно уравновешенную стартовым буфером (20 мМ ацетата натрия, 150 мМ натрия хлорида, pH=5,3). По окончании нанесения сорбент промывали 3 CV стартового буфера и 5 CV щелочного буфера, содержащего 1 М натрия хлорид. Элюировали целевой белок с сорбента буфером с ацетатом натрия (pH=3,7). Сбор фракции начинали при OD=200 mAU (λ=280 нм) и заканчивали при снижении до 200 mAU. Финальную очистку проводили последовательной фильтрацией через сорбенты Eshmuno CPX (“MERCCK”) и Capto Adhere (“Cytiva”, Швеция), уравновешенные 3 CV стартового буфера. По окончании

нанесения образца хроматографию продолжали, промывая колонку р-ром стартового буфера. Сбор фракции фильтрата начинали при достижении OD=200 mAU (при λ=280 нм) и заканчивали при снижении до 300 mAU.

Измерение профиля гликозилирования IgG1

Для отщепления гликанов от IgG1 использовали фермент PNGase F (производства АО «Генериум»). Образцы дериватизировали р-ром, содержащим флуорофор 2-аминобензойную кислоту (2AA). Меченые 2AA-гликаны были проанализированы с использованием хроматографической системы Waters Alliance с флуориметрическим детектором 2475 при длинах волн возбуждения 260 нм и эмиссии 425 нм на колонке AdvanceBio Glycan Map (2,1×150 мм, Agilent) в градиенте подвижных фаз ацетонитрила и 100 мМ формиата аммония, pH=4,5. Содержание каждого гликана рассчитывали методом нормализации площадей и выражали в процентах. Общий процент содержания гликановых групп рассчитывали следующим образом:

$$\frac{\text{Галактозилированные, \%}}{(\sum S)} = \frac{(G1+G1F+G1FB+G2+G2F)}{(\sum S)} \times 100;$$

$$\frac{\text{Афукозилированные, \%}}{(\sum S)} = \frac{(G0+G0N+G1+G2)}{(\sum S)} \times 100;$$

$$\frac{\text{Высоканозные, \%}}{(\sum S)} = \frac{(\text{Man3}+\text{Man5}+\text{Man6}+\text{Man7}+\text{Man8})}{(\sum S)} \times 100;$$

$$\frac{\text{Сиалированные, \%}}{(\sum S)} = \frac{(G1FS1+A1+A1F+A2+A2F)}{(\sum S)} \times 100;$$

где $\sum S$ — сумма площадей всех пиков гликанов.

Статистический обсчет результатов был выполнен в программе Graph Pad Prism 6. Использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA test) или t-критерий Стьюдента (unpaired t-test). Если $p_{\text{value}} < 0,0001 = ****$; $p_{\text{value}} < 0,001 = ***$; если $p_{\text{value}} < 0,01 = **$; $p_{\text{value}} < 0,05 = *$; ns — нет

статистической разницы; данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (SD).

Результаты и их обсуждение

Провели ряд экспериментов для изучения и регулирования профиля гликозилирования рекомбинантного человеческого IgG1:

1) Влияние длительности культивирования на гликопрофиль IgG1

Продуценты IgG1 получены на основе суспензионной линии CHO-S, культивировали в течение 11, 12, 13 и 14 сут (рис. 1). Жизнеспособность продуцентов во всех

группах оставалась высокой и не снижалась менее 80% (рис. 1E). Плотность жизнеспособных клеток для всех групп не различалась (рис. 1F). Продуктивность белка после очистки представлена на рис. 1G. Наблюдали статистически подтвержденное снижение содержания галактоз (рис. 1A) и силовых кислот (рис. 1D) с увеличением продолжительности культивирования продуцентов.

2) Влияние коммерческого регулятора на содержание афукозилированных гликанов

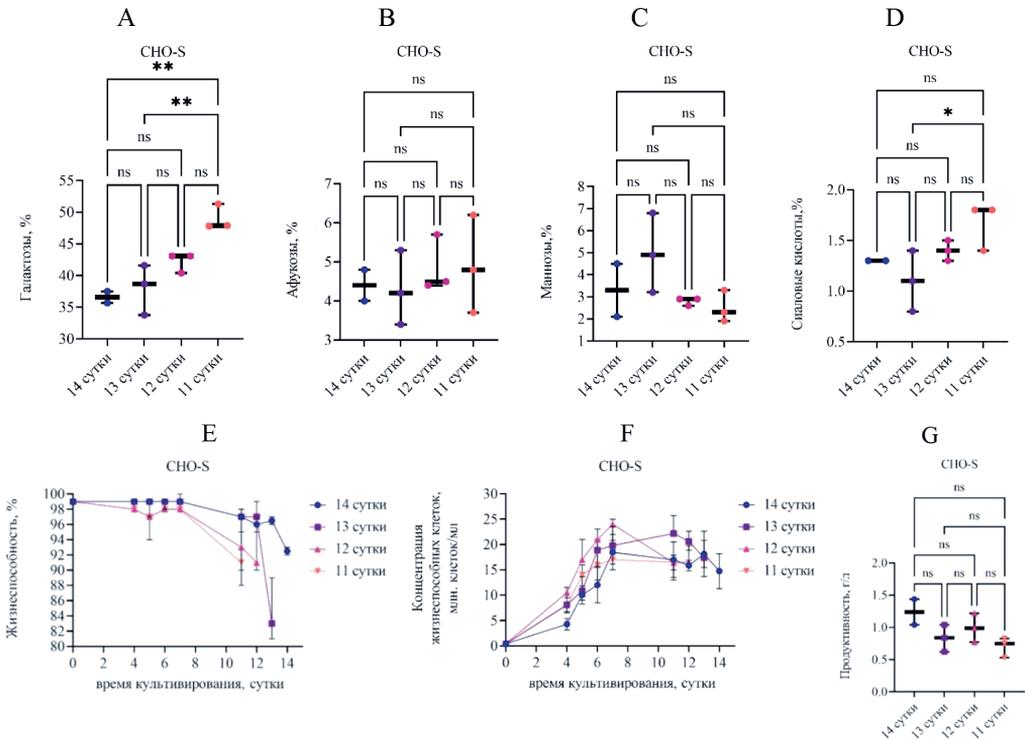


Рис. 1. Культивирование продуцентов IgG1 на основе клеток линии CHO-S в течение 11, 12, 13 и 14 сут. **Примечание:** ростовая среда BalanCD, подкормка BalanCD Feed 4 с 3-х сут до конца процесса культивирования. Концентрация жизнеспособных клеток во время посева 0,4 млн клеток/мл. Объем культивирования 20 мл. Снижение температуры на 6 сут до 32°C.

Fig. 1. Cultivation of IgG1 producers based on CHO-S cell line cells during 11, 12, 13, and 14 days. **Note:** BalanCD growth medium, BalanCD Feed 4 from day 3 to the end of the culturing process. Concentration of viable cells at the time of seeding – 0.4 million cells/ml. Culturing volume – 20 ml. Decrease in temperature to 32°C on day 6.

Продуценты IgG1 получены на основе суспензионной линии CHO-GS, культивирование проводили при 37°C. При равных ростовых и продукционных показателях (рис. 2Е, -F, -G) наблюдали статистически значимое снижение афукозилированных гликанов (рис. 2В) при добавлении регулятора EM-N-glycan regulator-2. Также наблюдали снижение содержания маннозных остатков, однако статистически это не было подтверждено (рис. 2С).

3) Влияние клеточной линии на глико-профиль IgG1

Продуценты IgG1 на основе двух клеточных линий CHO-S и CHO-K1 культивировали в одинаковых условиях в течение 14 сут с температурным шифтом до 32°C на 6 сут процесса. Можно наблюдать, что жизнеспособность продуцента IgG1 на основе клеток линии CHO-S оставалась выше на всем протяжении процесса (рис. 3А). Плотность жизнеспособных

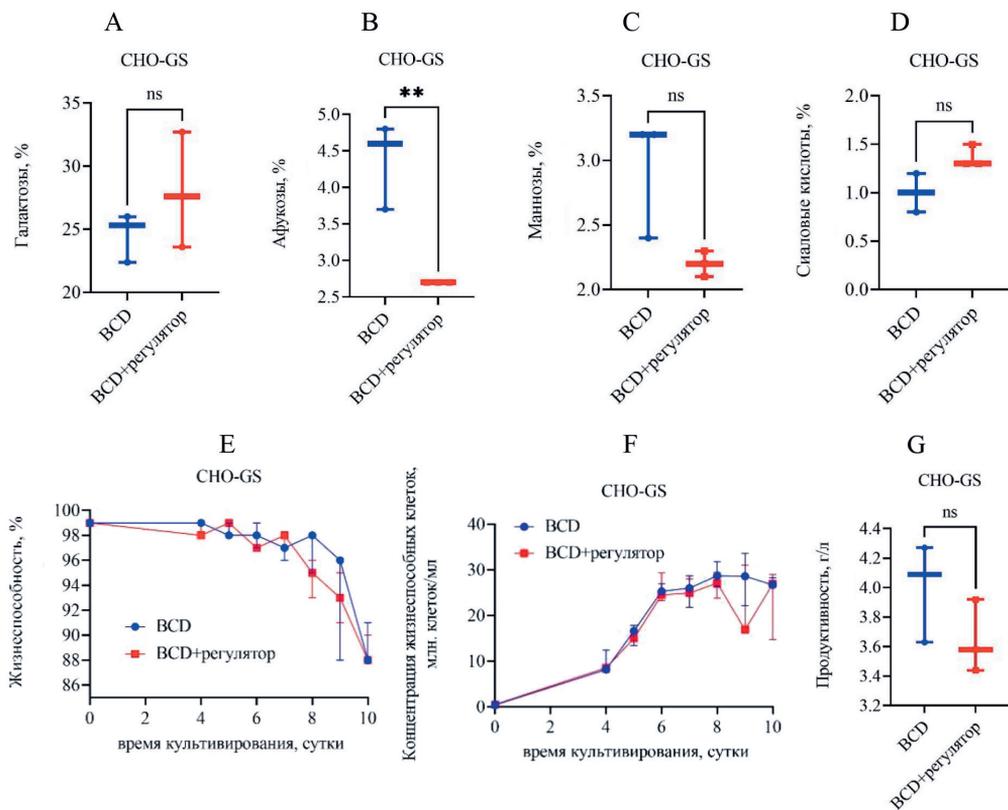


Рис. 2. Культивирование продуцентов IgG1 на основе клеток линии CHO-GS в течение 10 сут с добавлением регулятора афукоз.

Примечание: ростовая среда BalanCD, подкормка BalanCD Feed 4 с 3-х сут до конца процесса культивирования. Концентрация жизнеспособных клеток во время посева 0,4 млн клеток/мл. Объем культивирования 20 мл. Добавка регулятора афукоз EM-N-glycan regulator-2, 1-3% от объема культивирования, однократно в первые сутки. Температурный режим — 37°C.

Fig. 2. Cultivation of IgG1 producers on the basis of CHO-GS cells during 10 days with the addition of an afucose regulator.

Note: BalanCD growth medium, BalanCD Feed 4 from day 3 to the end of the culturing process. Concentration of viable cells at the time of seeding – 0.4 million cells/ml. Culturing volume – 25 ml. Addition of EM-N-glycan regulator-2 afucose regulator – 1–3% of the cultivation volume, once on day 1. Temperature regime — 37°C.

клеток на протяжении всего процесса культивирования наблюдали выше у продуцента IgG1 на основе клеток линии CHO-K1 (рис. 3F). Продуктивность продуцентов IgG1 на основе клеток линии CHO-K1 значительно отличалась от продуктивности продуцентов IgG1 на основе клеток линии CHO-S и составляла 3,7 г/л против 1,0 г/л. Наблюдали следующие различия в гликопрофиле: снижение галактоз у продуцентов на основе CHO-K1 (рис. 3A), значительное отличие в количестве афукозилированных гликанов продуцентов двух групп (рис. 3B).

4) Влияние коэкспрессии фермента Fut8 на гликопрофиль IgG1

Коэкспрессия ферментов, отвечающих за биосинтез определенных гликанов, может повлечь за собой изменение различных гликоформ. Проводили эксперимент с получением продуцентов, коэкспрессирующих IgG1 и внутриклеточный Fut8. У продуцентов, коэкспрессирующих Fut8, наблюдали снижение галактоз (рис. 4A), афукоз (рис. 4B) и сиаловых кислот (рис. 4D), вместе с тем наблюдали значительное повышение маннозных остатков (рис. 4C).

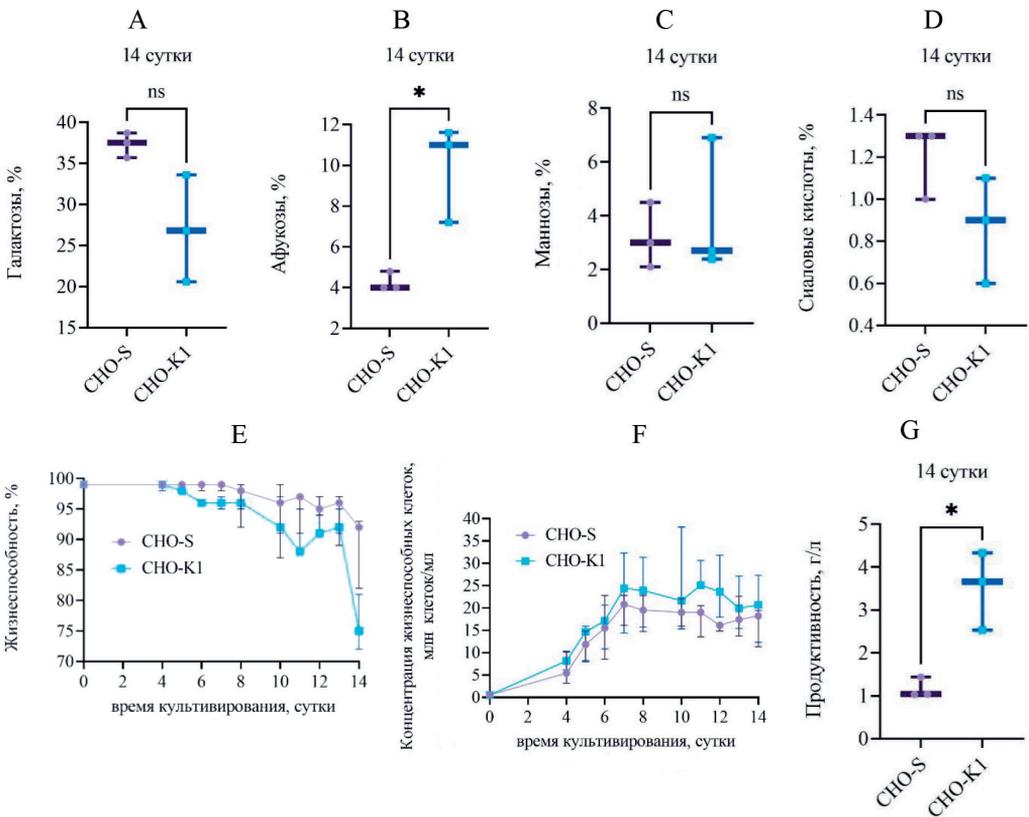


Рис. 3. Культивирование продуцентов IgG1 на основе клеток линии CHO-S и CHO-K1 в течение 14 сут.

Примечание: ростовая среда BalanCD, подкормка BalanCD Feed 4 с 3-х сут до конца процесса культивирования. Концентрация жизнеспособных клеток во время посева 0,4 млн клеток/мл. Объем культивирования 20 мл.

Fig. 3. Cultivation of IgG1 producers on the basis of CHO-S and CHO-K1 cells during 14 days.

Note: BalanCD growth medium, BalanCD Feed 4 from day 3 to the end of the culturing process. Concentration of viable cells at the time of seeding – 0.4 million cells/ml. Culturing volume – 20 ml.

Ростовые (данные не приведены) и продукционные характеристики при этом не отличались (рис. 4Е).

В биотехнологической промышленности используют клетки млекопитающих при производстве терапевтических белков для получения гликозилирования, подобного белкам человека [10], но сложности управления структурами гликанов по-

прежнему представляют существенную проблему.

Гликозилирование белков может влиять на время полувыведения, эффекторную функцию и иммуногенность, что напрямую влияет на эффективность и безопасность препарата [11]. Поэтому регуляция гликозилирования терапевтического белка занимает важное место при разработке

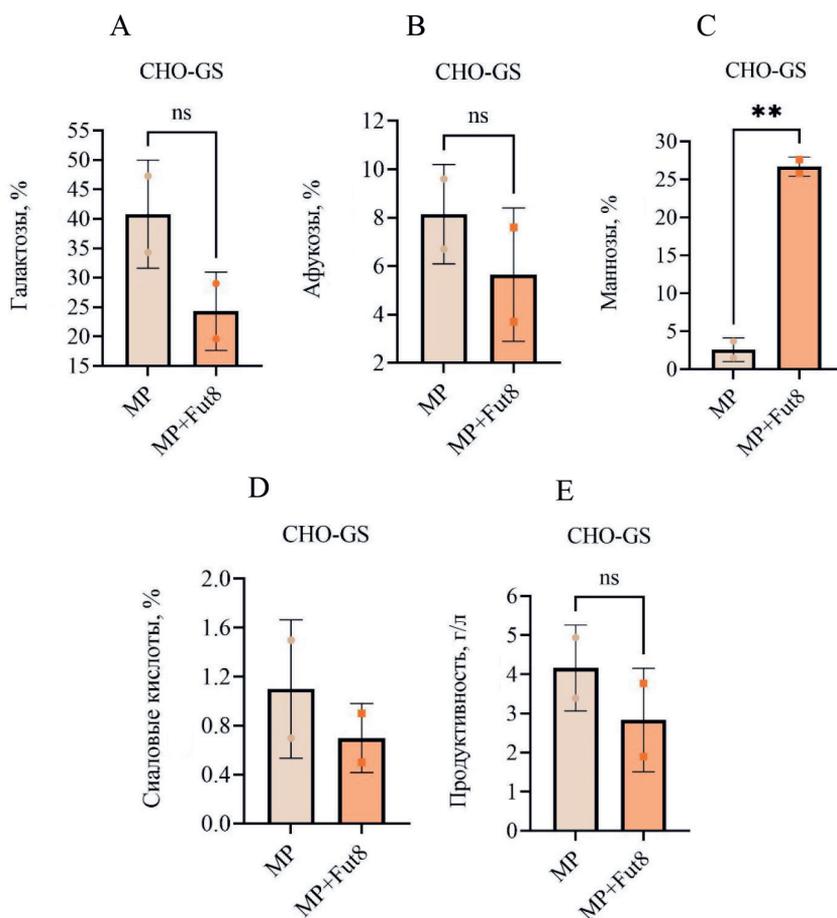


Рис. 4. Культивирование продуцентов IgG1 с котрансфекцией ферментом *Fut8* на основе клеток линии CHO-GS в течение 10 сут при температуре 37°C.

Примечание: ростовая среда *BalanCD*, подкормка *BalanCD Feed 4* с 3-х сут до конца процесса культивирования. Концентрация жизнеспособных клеток во время посева 0,4 млн клеток/мл. Объем культивирования 20 мл.
Fig. 4. Cultivation of IgG1 producers with cotransfection with *Fut8* enzyme on the basis of CHO-GS cells during 10 days at 37°C.

Note: *BalanCD* growth medium, *BalanCD Feed 4* from day 3 to the end of the culturing process. Concentration of viable cells at the time of seeding – 0.4 million cells/ml. Culturing volume – 20 ml.

лекарственных средств. Понимание того, в каком направлении и в какой степени можно регулировать гликозилирование IgG, является важной задачей для получения эффективных терапевтических препаратов на основе рекомбинантных IgG.

Способность контролировать гликозилирование необходима для воспроизводимости желаемых свойств терапевтических белков. Во время разработки лекарственного препарата необходимо стремиться достичь оптимального и постоянного гликопрофиля продукта, который должен быть определен в самом начале его разработки и поддерживаться постоянным на протяжении всех стадий производства, тем самым обеспечивая его терапевтическую эффективность и безопасность.

Выводы

В результате экспериментов было показано, каким способом можно влиять на гликопрофиль рекомбинантного человеческого IgG1:

1) снижение галактоз можно осуществить с помощью длительности культивирования;

2) снижения афукозилированных гликанов можно добиться за счет добавления регулятора афукоз EM-N-glycan regulator-2;

3) коэкспрессия фермента Fut8 приводит к увеличению маннозных остатков.

Данные подходы для регулирования гликанов можно применять во время разработки биофармацевтических препаратов на основе человеческого IgG1, полученных с использованием клеточных линий CHO.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Гузов Е.А., Цирулева М.А., Исеркапов А.В., Тюкова А.П., Казин В.Н., Колышкин В.М., Игнат'ев В.Г. Влияние глюкозамина и ионов меди на формирование профиля гликозилирования моноклональных антител в клетках CHO. *Биотехнология*. 2023;39(2):3–9. [Guzov E.A., Ciruleva M.A., Iserkapov A.V., Tyukova A.P., Kazin V.N., Kolyshkin V.M., Ignat'ev V.G. Vliyaniye glyukozamina i ionov medi na formirovaniye profilya glykozilirovaniya monoklonal'nyh antitel v kletkah CHO [The effect of glucosamine and copper ions on the formation of the glycosylation profile of monoclonal antibodies in CHO cells]. *Biotechnology*. 2023;39(2):3–9. (In Russian)]. DOI: 10.56304/S0234275823020035.
2. Дорохов Ю.Л., Шешукова Е.В., Кособокова Е.Н., Шиндяпина А.В., Косоруков В.С., Комарова Т.В. Роль углеводных остатков в функционировании иммуноглобулина G человека и терапевтических моноклональных антител. *Биохимия*. 2016;81(8):1069–1090. [Dorohov Yu.L., Sheshukova E.V., Kosobokova E.N., Shindyapina A.V., Kosorukov V.S., Komarova T.V. Rol' uglevodnyh ostatkov v funkcionirovaniy immunoglobulina G cheloveka i terapevticheskikh monoklonal'nyh antitel [Role of carbohydrate residues in the function of human immunoglobulin G and therapeutic monoclonal antibodies]. *Biochemy*. 2016;81(8):1069–1090. (In Russian)].
3. Тимонова С.С., Смолова К.А., Зарипова Д.Т., Пантюшенко М.С., Королева М.А., Анисимов Р.Л., Хамитов Р.А., Пискунов А.А., Бадэ В.Н. Увеличение продуктивности клеточной линии-производителя арилсульфатазы В за счет коэкспрессии формилглицин генерирующего фермента. *БИОпрепараты*. *Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(1):80–93. [Timonova S.S., Smolova K.A., Zaripova D.T., Pantyushenko M.S., Koroleva M.A., Anisimov R.L., Hamitov R.A., Piskunov A.A., Bade V.N. Uvelicheniye produktivnosti kletochnoj linii-producenta arilsulfatazy B za schet koekspressii formilglycin generiruyushchego fermenta] [Increased productivity of the aryl sulfatase B producing cell line due to co-expression of the formylglycine-generating enzyme]. *Biological products. Prevention, diagnosis, treatment*. 2022;22(1):80–93. (In Russian)]. DOI: 10.56304/S0234275824010113.
4. Abès R., Teillaud J.L. Impact of Glycosylation on Effector Functions of Therapeutic IgG. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2010;3(1):146–157.
5. Aoyama M., Hashii N., Tsukimura W., Osumi K., Harazono A., Tada M., Kiyoshi M., Matsuda A., Ishii-Watabe A. Effects of terminal galactose residues in mannose α -6 arm of Fc-glycan on the effector functions of therapeutic monoclonal antibodies. *MAbs*. 2019;11(5):826–836.
6. Barolo L., Abbriano R.M., Commault A.S., George J., Kahlke T., Fabris M., Padula M.P., Lopez A., Ralph P.J., Pernice M. Perspectives for Glyco-Engineering of Recombinant Biopharmaceuticals from Microalgae. *Cells*. 2020;9(3):633.
7. Ehret J., Zimmermann M., Eichhorn T., Zimmer A. Impact of cell culture media additives on IgG glycosylation produced in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*. 2019;116(4):816–830.
8. Goetze A.M., Liu Y.D., Zhang Z., Shah B., Lee E., Bondarenko P.V., Flynn G.C. High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies

- increase serum clearance in humans. *Glycobiology*. 2011;21(7):949–959.
9. Higel F., Seidl A., Sörgel F., Friess W. N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2016;100:94–100.
 10. Hossler P., Khattak S.F., Li Z.J. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology*. 2009;19(9):936–949.
 11. Loeblich S., Clark E., Ladd K., Takahashi S., Brousseau A., Kitchener S., Herbst R., Ryll T. Comprehensive manipulation of glycosylation profiles across development scales. *MAbs*. 2019;11(2):335–349.
 12. Peipp M., Lammerts van Bueren J.J., Schneider-Merck T., Bleeker P.W., Dechant M., Beyer T., Repp R., van Berkel P.H., Vink T., van de Winkel J.G., Parren P.W., Valerius T. Antibody fucosylation differentially impacts cytotoxicity mediated by NK and PMN effector cells. *Blood*. 2008;112(6):2390–2399.
 13. *Process for manipulating the level of glycan content of a glycoprotein*. Leiske D.R., Trentalange M.T. Patent US 10,167,492 B2, 01.01.2019. Application No.: 15/529,950 from 01.12.2015.
 14. *Process of obtaining glycoprotein composition with increased afucosylation content*. Makkapati S., Nikam V.S., Subrahmanyam S. Patent WO 2013/114165 A1, 08.08.2013. International Application No.: PCT/IB2012/057091 from 08.12.2012.
 15. Reusch D., Tejada M.L. Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes. *Glycobiology*. 2015;25(12):1325–1334.
 16. Ryman J.T., Meibohm B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* 2017;6(9):576–588.
 17. Schjoldager K.T., Narimatsu Y., Joshi H.J., Clausen H. Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020;21(12):729–749.
 18. Shalel L.S., Aharonovitz O., Maor-Shoshani A., Abraham G., Kenett D., Aloni Y. An efficient method to control high mannose and core fucose levels in glycosylated antibody production using deoxymannojirimycin. *Journal of Biotechnology*. 2018;276-277:54–62.
 19. Vlasak J., Ionescu R. Heterogeneity of Monoclonal Antibodies Revealed by Charge-Sensitive Methods. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2008;9(6):468–481.
 20. Yang G., Wang Q., Chen L., Betenbaugh M.J., Zhang H. Glycoproteomic Characterization of FUT8 Knock-Out CHO Cells Reveals Roles of FUT8 in the Glycosylation. *Frontiers in Chemistry*. 2021;9:755238.
 21. Zhang L., Luo S., Zhang B. Glycan analysis of therapeutic glycoproteins. *MAbs*. 2016;8(2):205–215.
 22. *Zinc supplementation for decreasing galactosylation of recombinant glycoproteins*. Gadgil M.C., Prabhu A.J., Gadre, R.V. Patent WO 2019/077628 A1, 25.04.2019. International Application No.: PCT/IN2018/050665 from 16.10.2028.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Тимонова Софья Сергеевна*, к.б.н., АО «ГЕНЕ-РИУМ»;
e-mail: Timonova@generium.ru

Sofia S. Timonova*, Cand. Sci. (Biol.), GENERIUM;
e-mail: Timonova@generium.ru

Полупанова Анна Алексеевна, АО «ГЕНЕ-РИУМ»;
e-mail: Aapolupanova@generium.ru

Anna A. Polupanova, GENERIUM;
e-mail: Aapolupanova@generium.ru

Кирик Инесса Анатольевна, к.б.н., АО «ГЕНЕ-РИУМ»;
e-mail: Kirik@generium.ru

Inessa A. Kirik, Cand. Sci. (Biol.), GENERIUM;
e-mail: Kirik@generium.ru

Карпунина Ольга Александровна, АО «ГЕНЕ-РИУМ»;
e-mail: karpunina.olga@generium.ru

Olga A. Karpunina, GENERIUM;
e-mail: karpunina.olga@generium.ru

Федоров Александр Андреевич, АО «ГЕНЕ-РИУМ»;
e-mail: sashaf19956@gmail.com

Alexander A. Fedorov, GENERIUM;
e-mail: sashaf19956@gmail.com

Зубарева Екатерина Валерьевна, АО «ГЕНЕ-
РИУМ»;
e-mail: zubareva@generium.ru

Ekaterina V. Zubareva, GENERIUM;
e-mail: zubareva@generium.ru

Мягкова Вера Витальевна, к.б.н., Eminence
Scientific (Suzhou) Co., Ltd.;
e-mail: Vera.Myagkova@eminencebio.com

Vera V. Myagkova, Cand. Sci. (Biol.), Eminence
Scientific (Suzhou) Co., Ltd.;
e-mail: Vera.Myagkova@eminencebio.com

Пискунов Александр Александрович, к.б.н.,
АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: a.piskunov@pharmasyntez.com

Alexander A. Piskunov, Cand. Sci. (Biol.), GENE-
RIUM;
e-mail: a.piskunov@pharmasyntez.com

Хамитов Равиль Авгатович, д.м.н., АО «ГЕ-
НЕРИУМ»;
e-mail: Khamitov@generium.ru

Ravil A. Khamitov, Dr. Sci. (Med.), GENERIUM;
e-mail: Khamitov@generium.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author