

Разработка процесса непрерывного культивирования клеток CHO – продуцентов рекомбинантного фактора свертываемости крови VIII

А.Н. Морозов, Г.Д. Сидельников, И.М. Емельянов, К.Е. Лапшин, Д.Р. Алимova

ООО «Международный Биотехнологический Центр «Генериум»,
Владимирская обл., п. Вольгинский, Россия

Development of continuous cultivation of CHO cells producing recombinant blood coagulation factor VIII

A.N. Morozov, G.D. Sidelnikov, I.M. Emelyanov, K.E. Lapshin, D.R. Alimova

International Biotechnology Center «Generium», Vladimir region, Volginskiy, Russia

Проведена разработка процесса перфузионного культивирования продуцента рекомбинантного фактора свертываемости крови VIII, созданного на основе клеток яичников китайского хомячка (CHO). Оптимизирован состав питательной среды, а также температура культивирования продуцента. Осуществлена апробация процесса культивирования в лабораторном биореакторе волнового типа. Показано значительное увеличение выхода активного белка в результате проведенной разработки.

Ключевые слова: рекомбинантный фактор свертываемости крови VIII; клетки CHO; перфузионное культивирование; оптимизация; биореактор.

Библиографическое описание: Морозов АН, Сидельников ГД, Емельянов ИМ, Лапшин КЕ, Алимova ДР. Разработка процесса непрерывного культивирования клеток CHO – продуцентов рекомбинантного фактора свертываемости крови VIII. Биопрепараты 2015; (4): 26–31.

Perfusion cultivation process for CHO cells producing recombinant B-omen deleted coagulation factor VIII was developed. Cell culture medium and feed supplement were optimized by screening of big panel of prototype media and supplements. Cultivation temperature was optimized for better expression of complex protein as well. Cultivation process was tested in a laboratory-scale perfusion bioreactor. Significant increase of productivity was shown as a result of the development.

Key words: recombinant coagulation factor VIII; CHO cells; perfusion cultivation; optimization; bioreactor.

Bibliographic description: Morozov AN, Sidelnikov GD, Emelyanov IM, Lapshin KE, Alimova DR. Development of continuous cultivation of CHO cells producing recombinant blood coagulation factor VIII. Biopreparation (Biopharmaceuticals) 2015; (4): 26–31.

Фактор VIII – крупный гликопротеин плазмы крови человека (размер до 300 кДа), являющийся необходимым кофактором протеолитической активации фактора X фактором IXa в рамках внутреннего механизма свертывания [1]. Количественный или качественный дефицит плазматического фактора VIII приводит к развитию тяжелого генетического заболевания – гемофилии А, поражающего 10–20 из 100000 мужчин. В настоящий момент наиболее эффективным способом профилактики и лечения гемофилии А является заместительная терапия препаратами фактора VIII.

Рекомбинантный человеческий фактор свертываемости крови VIII (rFVIII), получаемый биотехнологическими методами из клеток животных, является эффективным и безопасным аналогом плазматического фактора VIII и оптимальным лекарственным средством для коррекции гемофилии А. При использовании рекомбинантного FVIII риск передачи вирусных заболеваний сводится к минимуму.

В связи с ростом потребления препаратов фактора VIII для профилактики геморрагических осложнений и повышении

требований к безопасности лекарственных средств актуальной является задача создания отечественных высокопроизводительных и надежных технологий производства рекомбинантного FVIII без использования компонентов животного происхождения. На данный момент в России применяются низкоэффективные роллерные технологии производства фактора VIII с использованием животной сыворотки крови в составе питательных сред.

rFVIII считается одним из наиболее сложных из продаваемых на рынке белков, производимых по рекомбинантной технологии [2]. Уровень экспрессии rFVIII на 2–3 порядка ниже уровня экспрессии сходных по размеру белков в тех же клеточных системах. Экспрессия мРНК также неэффективна, а значительная часть первично транслированного продукта имеет некорректный фолдинг и быстро подвергается деградации внутри клетки [3, 4]. Часть секретируемого белка имеет тенденцию к сорбции на фосфолипидах клеточной мембраны и последующей деградации [5]. И, наконец, после секреции в питательную среду фактор VIII подвержен проте-

олизу и требует либо стабилизации белком-носителем – таким как, например, фактор фон Виллебранда, – либо быстрого вывода из биореактора и очистки от протеаз, находящихся в культуральной жидкости.

Как следствие, особую актуальность при разработке технологии производства rFVIII приобретает оптимизация состава питательной среды и параметров процесса культивирования, улучшающих процессинг и секрецию целевого белка и снижающих долю фракции FVIII, сорбируемой клеточной мембраной. Не менее важным условием получения качественного белка является использование технологии непрерывного суспензионного культивирования, которая позволяет минимизировать время пребывания секретированного FVIII в реакторе и, тем самым, уменьшать протеолиз и сохранять удельную активность белка. Необходимо отметить, что практически все зарубежные технологии производства препарата rFVIII основаны на использовании непрерывного культивирования.

Основным направлением технологии непрерывного культивирования в биофармацевтическом производстве является перфузионный процесс. Он заключается в постоянном поступлении в биореактор с определенной скоростью свежей питательной среды и отводе с той же скоростью отработанной культуральной жидкости с сохранением клеточной биомассы внутри реактора. Отделение биомассы от отработанной культуральной жидкости достигается использованием различных сепарирующих устройств, таких как наклонные осадители, проточные центрифуги, ультразвуковые сепараторы, модули тангенциальной фильтрации, спин-фильтры и т.д. [6]. В последние 10–15 лет технологии перфузионного культивирования были значительно усовершенствованы, что сделало непрерывные процессы более надежными, масштабируемыми и производительными. Благодаря этому перфузионные процессы получают все большее распространение в фармацевтической промышленности.

Перфузионные процессы позволяют достигать в реакторах высоких клеточных плотностей, несравнимых с таковыми в периодических процессах (до 200–250 млн. кл./мл). Постоянное выведение культуральной жидкости из реактора в охлаждаемый сборник повышает сохранность высоколабильных белков, таких как, например, факторы свертываемости крови. В ходе непрерывного культивирования существует возможность управления скоростью клеточного роста для повышения экспрессии рост-зависимых белков и поддержания культуры клеток в активном состоянии. Кроме того, в некоторых случаях оптимизация перфузионного процесса способна продлить продолжительность культивирования до нескольких недель и даже месяцев, повышая тем самым экономическую эффективность процесса.

Разработка перфузионного культивирования является комплексной задачей. Основные стадии оптимизации требуют большого расхода питательных сред и использования исключительно биореакторного оборудования со сложными системами перфузии, тогда как периодические процессы сейчас можно достаточно эффективно разрабатывать, практически не выходя за рамки объемов в несколько миллилитров. Кроме того, опыт разработки перфузионных процессов в отраслевой литературе описан крайне скудно и, зачастую, является коммерческой тайной фармацевтических компаний. Это

делает разработку перфузии нетривиальной задачей и повышает ценность каждого эксперимента и всей разработки в целом.

В данной статье описаны наиболее важные этапы разработки процесса перфузионного культивирования клеток CHO, продуцирующих рекомбинантный FVIII с deletированным В-доменом (BDD-FVIII). В начале разработки эксперименты проводились в малых объемах и включали в себя подбор базовой питательной среды и фидирующих добавок, а также первичный скрининг параметров культивирования. Апробация полученных данных и дальнейшая оптимизация велись в лабораторных биореакторах волнового типа со встроенной системой перфузии.

Материалы и методы

Клоны-продуценты были получены с использованием суспензионной линии клеток CHO-DG44 методом введения генетической конструкции, несущей ген фактора VIII с deletированным В-доменом (BDD-FVIII). В результате высокопроизводительного скрининга был выбран клон, обладающий лучшими ростовыми и продукционными характеристиками. Базовая среда культивирования, на которой был получен клон – SFM4CHO («HyClone») с добавлением 6 ммоль/л L-глутамина («Applichem», Германия).

На первом этапе культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 125 мл в режимах батч и модельной перфузии, стартовая концентрация клеток составляла 0,5 млн./мл. Культивирование велось в шейкере-инкубаторе Klimoshaker ISF1-XC («Kuhner», Швейцария) с радиусом вращения 25 мм, в атмосфере с 5% содержанием CO₂, при перемешивании со скоростью 90 об/мин, при температурах от 37 до 28°C. Подсчет числа клеток и анализ их жизнеспособности осуществляли после окрашивания трипановым синим в камере Фукса-Розенталя с использованием микроскопа Eclipse TS100 («Nikon», Япония).

При масштабировании процесса культивирования использовали одноразовые перфузионные биореакторы волнового типа с рабочим объемом 1 л («Sartorius Stedim», Германия). Частота качания платформы биореактора устанавливалась на уровне 22–32 кач/мин, угол наклона – 6,0°–7,0°. Посевная плотность клеток составляла 0,5 млн./мл, скорость подачи сжатого воздуха – 0,2 л/мин при 5%-ном содержании CO₂. Для поддержания концентрации растворенного кислорода в суспензии на уровне 30% от насыщения газовая смесь автоматически обогащалась чистым кислородом. Клетки культивировали при температуре 37°C в течение 5 суток, далее температуру снижали до экспериментального уровня.

Специфическую активность rFVIII в культуральной жидкости определяли хромогенным методом с использованием набора TECHNOCHROM® FVIII:C («Technoclone GmbH», Австрия). В качестве стандарта использовали European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard FVIII, 10,4 IU/ml.

Для оценки качества выделенного FVIII использовали электрофоретическое разделение белков в восстанавливающих условиях в 7,5% полиакриламидном геле, с последующим окрашиванием серебром, посредством набора Silver Stain Kit («Thermo Scientific», США).

Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов стояла задача оптимизации базовой среды культивирования. Для ее решения был проведен скрининг библиотеки прототипных питательных сред и определена наиболее эффективная среда для имеющегося продуцента. Необходимо отметить, что на данной стадии разработки непрерывного процесса для упрощения работы возможно использование периодического культивирования. Для скрининга было отобрано 20 прототипных питательных сред компании «HyClone», не содержащих компонентов животного происхождения и относящихся к классу **protein-free**, т.е. безбелковых сред. Перед началом эксперимента была проведена адаптация к исследуемым средам в течение трех пассажей с постепенным возрастанием концентрации прототипной среды и уменьшением концентрации среды SFM4CHO. По итогам адаптации были отсеяны 10 сред-кандидатов, очевидно уступающих остальным по способности поддерживать активный рост клеток продуцента. Результаты адаптации представлены на рисунке 1.

После завершения адаптации был проведен основной эксперимент, в котором оценивались как пролиферация клеток, так и синтез активного FVIII в ходе простого периодического процесса длительностью 8 суток. Сравнительное культивирование вели в колбах Эрленмейера объемом 125 мл при температуре 37°C.

На рисунке 2 показаны кривые роста клеток продуцента и динамика изменения концентрации активного фактора VIII в культуральной жидкости в ходе эксперимента на десяти отобранных средах (для лучшей визуализации показаны 2 лучших и 2 худших результата). Как видно из графика, среда RDMP-2 поддерживала наибольшую скорость роста культуры клеток и обеспечивала высокую жизнеспособность на протяжении всех 8 сут культивирования. Пик содержания активного белка в КЖ приходится у большинства сред на 3–5 сутки, после чего происходит быстрое падение активности, по-видимому, в результате протеолиза целевого белка. Среда RDMP-2 показала также лучший результат по содержанию активного белка, что позволило выбрать ее в качестве базовой среды культивирования для продолжения оптимизации.

Во второй серии экспериментов оценивали влияние на клеточные показатели различных добавок к питательным средам. Все добавки (5 наименований) были предоставлены компанией «HyClone» и относились к классу химически определенных (chemically defined). Точный химический состав таких добавок, как правило, является коммерческой тайной производителя. Их общий качественный состав отражен в таблице 1. Как видно из таблицы, в экспериментах были охвачены все основные классы веществ, влияющих на клеточный рост и экспрессию целевого белка.

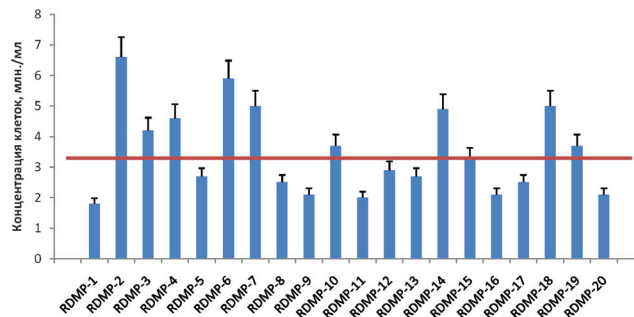


Рис. 1. Рост клеток продуцента после адаптации к экспериментальным средам «HyClone». Показаны концентрации клеток через 72 ч после пересева с начальной концентрацией 0,4 млн. кл./мл. Линия, параллельная оси X, показывает границу концентрации клеток, ниже которой соответствующую питательную среду исключали из эксперимента.

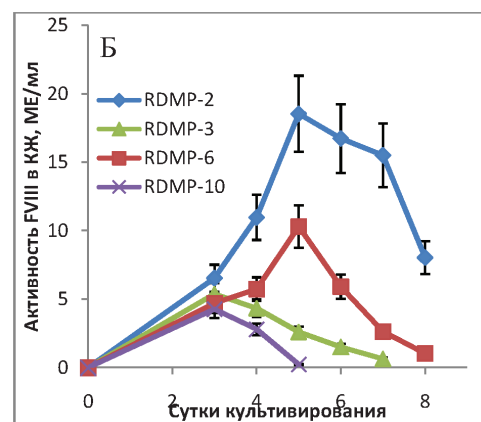
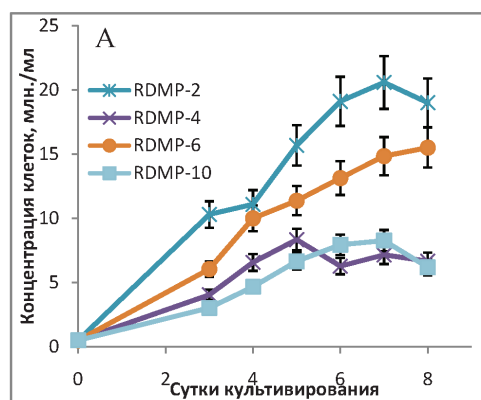


Рис. 2. Графики роста (А) и продуктивности (Б) клеток-продуцента в ходе скрининга питательных сред «HyClone» в режиме батч.

Таблица 1. Качественный состав нутриентных добавок компании «HyClone», используемых в эксперименте

Добавка	Классы веществ, входящие в состав добавки					
	глюкоза	аминокислоты	витамины	микроэлементы	факторы роста	липиды
CellBoost 1	•	•				
CellBoost 2	•	•	•			
CellBoost 3	•	•	•	•		
CellBoost 4	•	•	•	•	•	
CellBoost 5	•	•	•	•	•	•

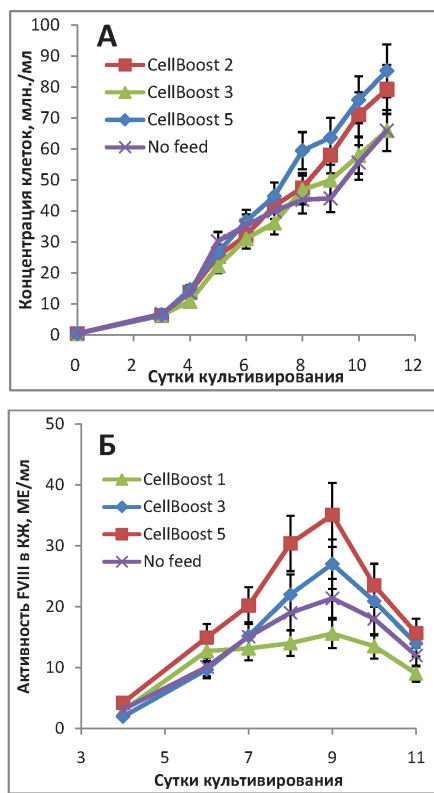


Рис. 3. Графики роста (А) и продуктивности (Б) клеток-продуцента в ходе скрининга нутриентных добавок «NuClone» в режиме модельной перфузии.

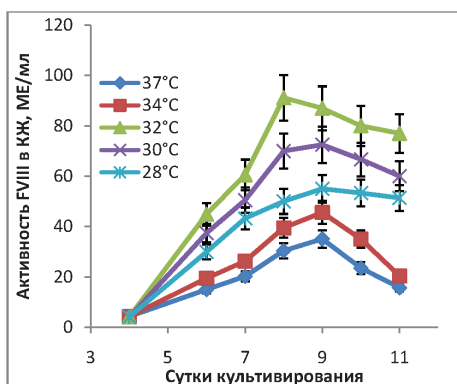


Рис. 4. Кривые продуктивности клеток в ходе культивирования при разных температурных режимах.

Таблица 2. Влияние температуры культивирования на ростовые и продукционные характеристики клона-продуцента gFVIII

№ п/п	Температура культивирования, °С	Максимальная концентрация клеток, млн./мл	Максимальная продуктивность, МЕ/мл
1	37±0,3	85	31
2	34±0,3	72	46
3	32±0,3	63	91
4	30±0,3	51	73
5	28±0,3	35	55

Для оценки эффективности тестируемых добавок эксперименты проводили в шейкерных колбах в режиме модельной перфузии с ежедневной заменой питательной среды RDMP-2, содержащей 10% добавки. В качестве контроля выступала базовая среда без добавок. Ежедневно оценивались концентрация и жизнеспособность клеток, а также активность белка в культуральной жидкости. На рисунке 3 представлены кривые роста клеток-продуцентов и содержания активного белка в культуральной жидкости в ходе эксперимента. Как видно, наибольший положительный эффект на рост и выживаемость клеток оказывала добавка CellBoost 5. Она также была лидером по увеличению концентрации активного белка. Исходя из этого, можно говорить о положительном влиянии добавления липидов на рост и продуктивность используемой клеточной культуры. Одно из объяснений этого может быть связано со снижением сорбции целевого белка на клеточных мембранах. Также можно отметить резкое падение продуктивности в лидерном варианте на 10-е сутки процесса. Это, по всей видимости, было вызвано критичным падением уровня растворенного кислорода в шейкерных колбах из-за высокой концентрации клеток (более 50 млн. кл/мл).

На третьем этапе исследований в качестве параметра оптимизации была выбрана температура культивирования. Как указывалось ранее, неоптимальные выходы gFVIII могут быть вызваны некорректным процессингом уже транслированного белка и последующей утилизацией мисфолдированного продукта внутри клетки, а также протеолизом секретированного белка в культуральной жидкости. Одной из причин этого может быть слишком высокий уровень температуры культивирования [7, 8].

Оптимальные значения температуры культивирования отличаются для разных стадий процесса, типов экспрессируемых белков, клеточных линий и даже отдельных клонов, полученных из одной клеточной линии. Диапазон температурных режимов, обычно применяемых в биотехнологических процессах, составляет 28–37°C. В экспериментах использовались 5 различных температур культивирования, охватывающих весь этот диапазон: (37±0,3) (контроль), (34±0,3), (32±0,3), (30±0,3) и (28±0,3)°C. Эксперименты проводили в шейкерных колбах в режиме модельной перфузии с ежедневной сменой среды, снижая температуру культивирования при достижении клетками концентрации 15 млн./мл. В таблице 2 представлены основные результаты эксперимента. На рисунке 4 приведен график изменения содержания активного белка в культуральной жидкости. Как видно, при температуре (32±0,3)°C достигается максимальная активность белка в культуральной жидкости. При этом максимальная продуктивность, полученная при 37°C, при 32 С была превышена в три раза, что вполне согласуется с данными литературы [13].

После определения оптимальной температуры культивирования эксперименты были продолжены в лабораторных перфузионных биореакторах. Были использованы одноразовые биореакторы волнового типа, произведенные компанией «Sartorius Stedim» (Германия). Данные реакторы имеют встроенные перфузионные мембраны с диаметром пор 1,2 мкм, оптические датчики для определения уровня pH и концентрации растворенного кислорода, фильтры для входа и выхода газовой смеси, а также системы пробоотбора, внесения инокулята и подачи щелочи для регулировки pH.

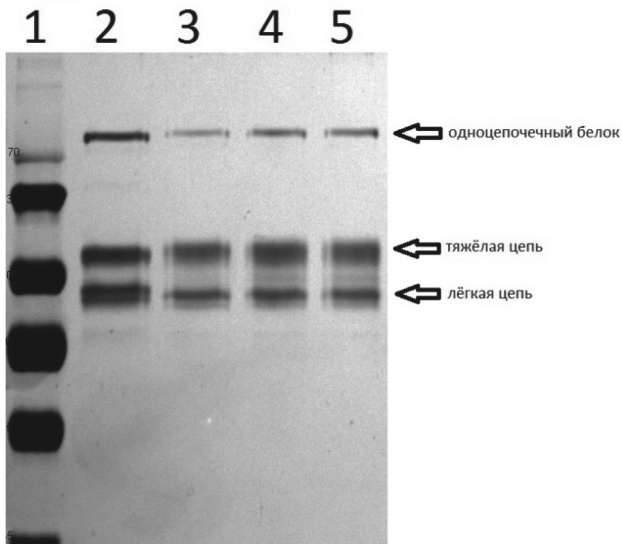


Рис. 6. Электрофорез очищенных образцов rFVIII из культуральной жидкости, полученной в разные сутки культивирования: дорожка 1 – маркер молекулярных масс (45; 55; 70; 100; 130; 170 кДа); дорожка 2 – стандартный образец BDD-rFVIII – ReFacto®; дорожка 3 – белок, выделенный в начале перфузионного процесса (5-е сутки культивирования); дорожка 4 – белок, выделенный в середине перфузионного процесса (9-е сутки культивирования); дорожка 5 – белок, выделенный в конце перфузионного процесса (13-е сутки культивирования).

Основной задачей экспериментов в перфузионных биореакторах являлось определение оптимальной концентрации нутриентной добавки CellBoost 5 в базовой среде. В силу определенных ограничений модельной перфузии в шейкерных колбах, данный эксперимент мог быть реализован только в условиях реального непрерывного процесса. В эксперименте использовали волновые биореакторы с рабочим объемом 1 л, а скорость перфузии была зафиксирована на уровне 1 объем биореактора/сутки. Температурный режим культивирования состоял из двух фаз: первые 5 суток культура росла при 37°C, затем температуру снижали до 32°C. Для предотвращения падения активности экспрессированного белка уже за пределами биореактора перфузат отводился в специальный охлаждаемый до 4°C сборник, из которого 1 раз в сутки весь собранный материал передавался на выделение и анализ целевого белка. В эксперименте использовали следующие концентрации нутриентной добавки: 5, 10, 15, 20 и 25%. На рисунке 5 представлены графики роста и продуктивности культуры в лидерном варианте – при концентрации добавки CellBoost 5 15%. Удельная активность выделенного белка в этом процессе составляла, в среднем, 8200 МЕ/мл, а основные полосы на электрофореграммах растворов выделенного белка и стандартного образца BDD-FVIII (препарат ReFacto®) совпадали по подвижности (рис. 6). Средняя продуктивность процесса составила 63 МЕ/(мл сут).

Заключение

В результате описанных шагов разработки и оптимизации процесса культивирования продуцента рекомбинантного FVIII

были обоснованы основные параметры перфузионного процесса – состав питательной среды и температурный режим культивирования. Также была проведена апробация культивирования в лабораторном перфузионном биореакторе волнового типа, в ходе которой был получен высокий выход активного белка необходимого качества.

Описанный подход к разработке перфузионного культивирования клеток млекопитающих может быть успешно применен как в случае лабильных продуктов, производимых по технологии рекомбинантной ДНК, так и в случае более стабильных белков, таких как моноклональные антитела. Данный подход позволяет разрабатывать эффективные, высокопроизводительные процессы производства рекомбинантных белков терапевтического назначения, потребность в которых продолжает неуклонно расти.

Литература:

1. Fay RJ. Factor VIII structure and function. *Int J Hematol.* 2006; 83: 103–8.
2. Casademunt E, Martinelle K, Jernberg M, Winge S, Tiemeyer M, Biesert L, et al. The first recombinant human coagulation factor VIII of human origin: human cell line and manufacturing characteristics. *Eur J Haematol.* 2012; 89(2): 165–76.
3. Miao H, Sirachainan N, Palmer L, Kucab P, Cunningham M, Kaufman R, Pipe S. Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion. *Blood* 2004; 103: 3412–9.
4. Kaufman RJ, Wasley LC, Davies MV, Wise RJ, Israel DI, Dorner AJ. Effect of von Willebrand factor coexpression on the synthesis and secretion of factor VIII in chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol.* 1988; 9(3): 1233–42.
5. Adamson R. Design and operation of a recombinant mammalian cell manufacturing process for rFVIII. *Ann Hematol.* 1994; 68: 9–14.
6. Clincke M, Molleryd C, Zhang Y, Lindskog E, Walsh K, Chotteau V. Very high cell density of CHO cells in perfusion by ATF or TFF in WAVE bioreactor. Part I. Effect of the cell density on the process. *Biotechnol Prog.* 2013; 29(3): 754–67.
7. Santagostino E. A new recombinant factor VIII: from genetics to clinical use. *Drug Des Devel Ther.* 2014; 8: 2507–15.
8. Kaufman RJ. Insight into the structure, function, and biosynthesis of factor VIII through recombinant DNA technology. *Ann Hematol.* 1991; 63(3): 155–65.
9. Ezban M, Vad K, Kjalke M. Turoctocog alfa (NovoEight) – from design to clinical proof of concept. *Eur J Haematol.* 2014; 93(5): 369–76.
10. Chotteau V, Bjorling T, Boork S, Brink-Nilsson H. Development of a large scale process for the production of recombinant truncated factor VIII in CHO cells under cell growth arrest conditions. In: Lindner-Olsson E. *Animal Cell Technology: From Target to Market.* Kluwer Academic Publ.; 2001. P. 287–91.
11. Chuppa S, Tsai Y, Yoon S, Shackelford S, Rozales C, Bhat R, et al. Fermentor temperature as a tool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells. *Biotechnol Bioeng.* 1997; 55(2): 328–38.
12. Genzel Y, Vogel T, Buck J, Behrendt I, Ramirez DV, Schiedner G, et al. High cell density cultivations by alternating tangential flow (ATF) perfusion for influenza A virus production using suspension cells. *Vaccine* 2014; 32(24): 2770–81.
13. Kolind MP, Norby PL, Flintegaard TV, Berchtold MW, Johnsen LB. The B-domain of Factor VIII reduces cell membrane attachment to host cells under serum free conditions. *J Biotechnol.* 2010; 147(3–4): 198–204.
14. Rasmussen PB. Method of producing proteins with FVIII activity and/or FVIII derivatives. Patent WO, № 1991000347 A1; 1991.

References

1. Fay RJ. Factor VIII structure and function. *Int J Hematol.* 2006; 83: 103–8.
2. Casademunt E, Martinelle K, Jernberg M, Winge S, Tiemeyer M, Biesert L, et al. The first recombinant human coagulation factor VIII of human origin: human cell line and manufacturing characteristics. *Eur J Haematol.* 2012; 89(2): 165–76.
3. Miao H, Sirachainan N, Palmer L, Kucab P, Cunningham M, Kaufman R, Pipe S. Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion. *Blood* 2004; 103: 3412–9.
4. Kaufman RJ, Wasley LC, Davies MV, Wise RJ, Israel DI, Dorner AJ. Effect of von Willebrand factor coexpression on the synthesis and secretion of factor VIII in chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol.* 1988; 9(3): 1233–42.
5. Adamson R. Design and operation of a recombinant mammalian cell manufacturing process for rFVIII. *Ann Hematol.* 1994; 68: 9–14.

6. Clincke M, Molleryd C, Zhang Y, Lindskog E, Walsh K, Chotteau V. Very high cell density of CHO cells in perfusion by ATF or TFF in WAVE bioreactor. Part I. Effect of the cell density on the process. *Biotechnol Prog.* 2013; 29(3): 754–67.
7. Santagostino E. A new recombinant factor VIII: from genetics to clinical use. *Drug Des Devel Ther.* 2014; 8: 2507–15.
8. Kaufman RJ. Insight into the structure, function, and biosynthesis of factor VIII through recombinant DNA technology. *Ann Hematol.* 1991; 63(3): 155–65.
9. Ezban M, Vad K, Kjalke M. Turoctocog alfa (NovoEight) – from design to clinical proof of concept. *Eur J Haematol.* 2014; 93(5): 369–76.
10. Chotteau V, Bjorling T, Boork S, Brink-Nilsson H. Development of a large scale process for the production of recombinant truncated factor VIII in CHO cells under cell growth arrest conditions. In: Lindner-Olsson E. *Animal Cell Technology: From Target to Market.* Kluwer Academic Publ.; 2001. P. 287–91.
11. Chuppa S, Tsai Y, Yoon S, Shackelford S, Rozales C, Bhat R, et al. Fermentor temperature as a tool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells. *Biotechnol Bioeng.* 1997; 55(2): 328–38.
12. Genzel Y, Vogel T, Buck J, Behrendt I, Ramirez DV, Schiedner G, et al. High cell density cultivations by alternating tangential flow (ATF) perfusion for influenza A virus production using suspension cells. *Vaccine* 2014; 32(24): 2770–81.
13. Kolind MP, Norby PL, Flintegaard TV, Berchtold MW, Johnsen LB. The B-domain of Factor VIII reduces cell membrane attachment to host cells under serum free conditions. *J Biotechnol.* 2010; 147(3–4): 198–204.
14. Rasmussen PB. Method of producing proteins with FVIII activity and/or FVIII derivatives. Patent WO, № 1991000347 A1; 1991.

Authors:

International Biotechnological Center «Generium», 14 Vladimirska Street, Vladimir region, Volginskiy, 601125, Russian Federation.
 Morozov AN. Head of the Process Development Department.
 Sidelnikov GD. Researcher of the Process Development Department. Candidate of Veterinarian Sciences.
 Emelyanov IM. Researcher of the Process Development Department.
 Lapshin KE. Researcher of the Process Development Department.
 Alimova DR. Junior researcher of the Process Development Department.

Об авторах

ООО Международный биотехнологический центр «Генериум». Российская Федерация, 601125, Владимирская область, п. Вольгинский, ул. Владимирская, 14.
 Морозов Антон Николаевич. Начальник отдела разработки процессов.
 Сидельников Георгий Дмитриевич. Научный сотрудник отдела разработки процессов, канд. вет. наук.
 Емельянов Илья Максимович. Научный сотрудник отдела разработки процессов.
 Лапшин Константин Евгеньевич. Научный сотрудник отдела разработки процессов.
 Алимova Динара Раилевна. Младший научный сотрудник отдела разработки процессов.

Адрес для переписки: Морозов Антон Николаевич; morozov@ibcgenerium.ru

Поступила 26.10.2015 г.
 Принята 06.11.2015 г.