

СОСТОЯНИЕ РАЗВИТИЯ ПОДХОДОВ К ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ, НАПРАВЛЕННЫХ ПРОТИВ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Обзор

© 2023 А.К. Мисорин, Д.О. Чернышова, М.С. Карбышев*

АО «Биокад», 198515 пос. Стрельна, Санкт-Петербург, Россия;
электронная почта: karbyshevms@biocad.ru

Поступила в редакцию 15.05.2023

После доработки 09.08.2023

Принята к публикации 23.08.2023

Биспецифические антитела (бсАт) относятся к группе многообещающих биотерапевтических препаратов, поскольку их структурные и функциональные особенности расширяют спектр их применения. бсАт способны связываться одновременно с двумя антигенами (или двумя эпитопами на одном антигене), кроме того, они могут направлять эффекторные иммунные клетки на опухолевые и доставлять различные вещества (радионуклиды, токсины и иммунологические агенты) к клеткам-мишеням, что позволяет широко использовать их в клинической практике. Настоящий обзор посвящён технологиям разработки платформ для создания бсАт, текущему прогрессу и перспективам их использования, а также выбору различных гетерологичных экспрессионных систем для производства белков. Кроме того, мы делимся своим мнением о перспективных платформенных решениях, предопределяющих векторы развития бсАт для терапии солидных опухолей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биспецифические антитела, инженерия антител, экспрессионные системы антител, СНО, НЕК293, *E. coli*, дизайн антител, солидные опухоли.

DOI: 10.31857/S0320972523090038, **EDN:** WSSNXQ

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении долгого времени человечество опирается на природные структуры и процессы для создания лекарств и методов лечения многих заболеваний [1]. Для разработки новых лекарственных средств в качестве альтернативы традиционным синтетическим, химически получаемым препаратам фармацевтическая и биотехнологическая промышленность обращается к биологическим компонентам, таким как пептиды, белки, ферменты или их комплексы, а также олигонуклеотиды, такие как ДНК или малые интерферирующие РНК [2].

Принятые сокращения: бсАт – биспецифические антитела; мкАт – моноклональные антитела; ПТМ – посттрансляционные модификации; BiTE – биспецифический Т-клеточный энгейджер; СНО – клетки яичников китайского хомячка; CL – константная лёгкая цепь; HC – тяжёлая цепь; НЕК293 – клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека; scFv – одноцепочечный вариабельный фрагмент; TCR – Т-клеточный рецептор.

* Адресат для корреспонденции.

Среди различных видов лекарственных средств термин «биотерапевтические препараты» или «биологические препараты» относится к широкой категории макромолекулярных лекарственных средств, включающих цитокины, факторы роста, гормоны, вакцины, белки, пептиды, а также препараты, состоящие из антител, действующее вещество которых получено из биологического источника. Моноклональные антитела (мкАт) представляют собой подкласс наиболее быстро развивающихся биотерапевтических препаратов, которые применяются для лечения хронических заболеваний, включая рак, аутоиммунные и инфекционные болезни [3, 4]. В настоящее время центральное место в терапевтическом применении мкАт отводится таргетной терапии опухолей и комплексной иммунотерапии рака [5] в сочетании с другими терапевтическими подходами [6]. Помимо применения при системной таргетной иммунотерапии, мкАт также являются ценным инструментом для диагностики [7, 8] и визуализации опухолей [9, 10].

Высокая антигенсвязывающая активность, стабильность и низкая иммуногенность — три основные физико-химические свойства, которые должны характеризовать антитела в контексте терапии [11]. Более того, было показано, что антитела поддаются белковой инженерии и обладают врождённой способностью связывать и антигены, и эндогенные иммунные рецепторы. Таким образом, универсальные характеристики терапевтических антител, включающие распознавание антигенов, их эффекторные свойства и увеличенный период полувыведения, обуславливают их механизм действия и эффективность [12].

Моноспецифический формат IgG может быть не идеальным для многих терапевтических применений [13, 14], поэтому был изобретён целый ряд форматов мультиспецифических антител (мсАт), способных связываться с разными антигенами или разными эпитопами на одном и том же антигене [15]. Несмотря на множество различных типов мсАт, основная проблема при их производстве заключается в том, что эти биомолекулы не всегда обладают желаемыми физическими и химическими характеристиками, что делает сложным их перевод в формат терапевтических продуктов. Более того, инновационные препараты из упомянутой группы, такие как биспецифические антитела (бсАт), состоят из разных цепей антитела с разной структурой и связывающими свойствами, поэтому существует много разных аспектов, связанных с белковой инженерией, которые должны учитываться в течение ранней разработки молекулы и процесса реализации технологий производства [16, 17]. Последние достижения генетики и белковой биохимии, а также доступность биопроцессов позволили успешно бороться с упомянутыми проблемами, и к настоящему времени отработаны различные методики получения бсАт в промышленных масштабах [18–20]. Данная статья посвящена потенциалу различных гетерологических систем экспрессии для продукции бсАт, исследуемых на поздних фазах клинических исследований, направленных на терапию солидных опухолей, а также объясняет необходимость дальнейшего развития рекомбинантной технологии антител.

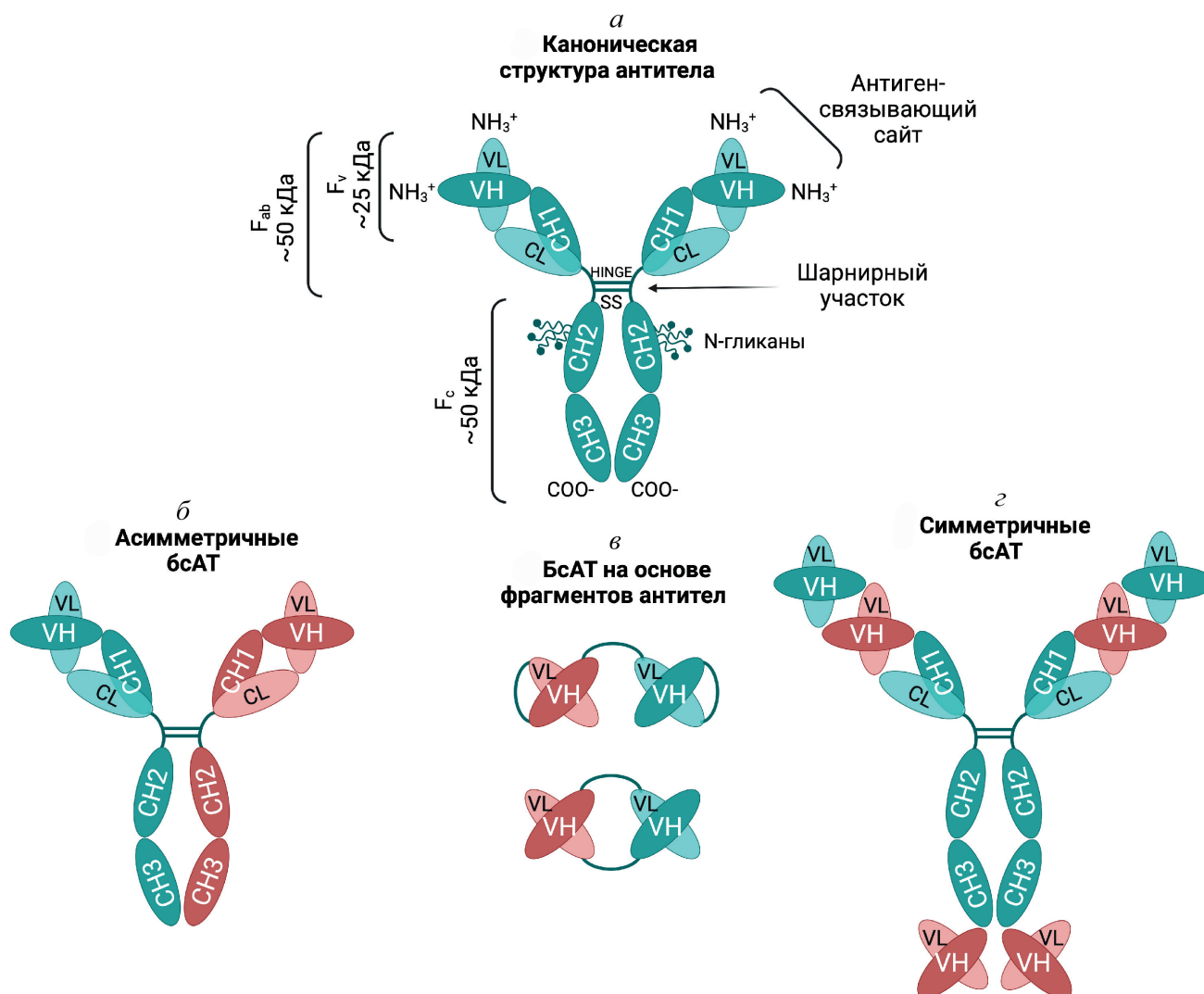
ДИЗАЙН СТРУКТУРЫ И СБОРКИ МОНО- И БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ

Каноническое IgG-антитело представлено различными Y-образными молекулярными формами и состоит из двух идентичных тяжё-

лых цепей (НС) и двух лёгких цепей (LC). Тяжёлая цепь состоит из 4-х доменов: трёх константных и одного вариабельного (СН1-СН3 и VH). Лёгкая цепь представлена двумя доменами: одним константным (CL) и одним вариабельным (VL). Дисульфидные связи соединяют тяжёлые цепи в шарнирном регионе между СН1- и СН2-доменами. Более того, каждая тяжёлая цепь соединена с лёгкой дисульфидной связью на стыке СН1 и CL. Константные домены СН2 и СН3 каждой тяжёлой цепи формируют Fc-фрагмент. Вариабельные домены лёгкой и тяжёлой цепей (VH и VL) соединены с близко расположенными СН1- и CL-доменами, формируя Fab-фрагмент антитела.

Существует несколько подходов к получению бсАт: получение разных типов антигенсвязывающих фрагментов (Fab, scFv, VHH) [21] и оптимизация канонической структуры антитела посредством различных типов мутаций, направленных на гетеродимеризацию лёгких и тяжёлых цепей [18, 22]. Из широкого ряда классификаций и систематизаций бсАт [14, 16] мы сосредоточились на подходящем подходе для уже упомянутых целей стратификации, который был определён недавно [18] и стал широко использоваться благодаря своей простоте. Основываясь на упомянутой систематике, все типы бсАт делятся на три группы: (i) асимметричные, (ii) симметричные и (iii) бсАт на основе фрагментов антител (рисунок).

Простейшим случаем являются бсАт на основе фрагментов, обычно получаемые путём слияния двух или более антигенсвязывающих фрагментов с различной специфичностью, таких как scFv-, VHH- или Fab-форматы, с помощью полипептидных линкеров. Чтобы обеспечить пролонгирование периода полувыведения, к молекуле может быть добавлен человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) [23, 24]. В результате может быть получена молекула, состоящая из одной полипептидной цепи. Благодаря своей простой структуре этот тип молекулы не сталкивается с проблемой некорректного спаривания цепи [25]. Между тем молекулы, которые принадлежат симметричному типу, могут содержать Fc-фрагмент, но в то же время иметь два антигенсвязывающих фрагмента к двум разным эпитопам на одной полипептидной цепи. Как правило, это либо канонические антитела, к которым через линкеры добавляются фрагменты scFv или VHH, либо бсАт на основе фрагментов, слитых с Fc-фрагментом. Обычно такие молекулы имеют тетравалентную структуру с двумя валентностями на каждую мишень. Для таких молекул не существует проблем, связанных



Структурные особенности трёх основных классов бсАт: а – каноническое IgG-антитело; б – асимметричное бсАт (Бивалент (1+1)); в – бсАт на основе фрагментов антител (tandem scFv, BiTE и Diabody), г – симметричное бсАт (Тетравалент (2+2))

с неправильной сборкой цепей. Третий тип бсАт является асимметричным и состоит из тяжёлой и лёгких цепей, полученных из разных родительских антител [26]. Для молекул этого типа при рекомбинантном получении наблюдается такая техническая проблема, как неправильное спаривание цепей, которая обычно решается путём введения мутаций, способствующих корректной гетеродимеризации тяжёлых и лёгких цепей.

Далее мы дадим подробное описание, в котором будут представлены основные направления и достижения коммерчески доступных технологических платформ для производства рекомбинантных бсАт, уделяя особое внимание прогрессу клинических разработок для лечения солидных опухолей.

Асимметричные бсАт. Xmab®. XmAb-платформа, разработанная компанией «Xencor», представляет собой набор аминокислотных

замен, предназначенных для введения в константные домены антител (от шарнирного региона до CH3) для снижения или усиления эффекторных свойств, увеличения периода полувыведения антитела и создания биспецифических молекул [27]. Коллеги из компании «Xencor» использовали рациональный *in silico* дизайн для определения оригинальных аминокислотных замен для гетеродимеризации тяжёлых цепей, одновременно обеспечивая и правильную сборку молекулы, и высокую термостабильность финальных биспецифических кандидатов [28]. Используя полученные модифицированные тяжёлые цепи, также дополнительно было оптимизировано смещение изоточки для каждой цепи для облегчения процесса очистки [27].

Azymetric®. Компанией «Zymeworks» был разработан альтернативный *in silico* алгоритм, основная особенность которого связана

с уникальными аминокислотными заменами для гетеродимеризации тяжёлых цепей. Также отметим, что компания смогла создать бсАт, состоящее из двух разных тяжёлых цепей и двух разных лёгких цепей посредством введения мутаций не только в СН3-домен, но и также в СН1- и CL-домены. Этот подход можно комбинировать с использованием каппа- и ламбда-семейств лёгких цепей.

CrossMab®. Разработанная компанией «Hoffman la Roche» платформа «CrossMab» облегчает правильную сборку бсАт с двумя разными лёгкими цепями и двумя разными тяжёлыми цепями. Основное преимущество этой технологии заключается в правильной межцепочечной димеризации, которая обеспечивается мутациями «knob-into-hole» [29]. Сама технология может быть реализована в трёх различных вариантах.

Первый вариант предполагает изоляцию СН1 и VL из тяжёлой цепи для второй специфичности в отдельную лёгкую цепь, тогда как соответствующие домены лёгкой цепи второй специфичности вставляются в тяжёлую цепь; этот вариант также называется «CrossMab Fab». При этом варианте инженерии бсАт основной проблемой становится образование независимых побочных продуктов, состоящих из димеров тяжёлых цепей (из-за комплементарности «knob-into-hole» и комплементарности СН1 на тяжёлой цепи первой специфичности и CL на тяжёлой цепи второй специфичности) и Fab-фрагмента (также из-за комплементарности СН1-CL на разных лёгких цепях). Второй вариант называется «CrossMab СН1-CL», при нём между лёгкими и тяжёлыми цепями второй специфичности меняются только домены СН1-CL. Теоретически такая замена предотвращает образование побочного продукта. Третий вариант, «CrossMab VH-VL», предполагает аналогичную замену переменных доменов в тяжёлой и лёгкой цепи второй специфичности. Используя такую замену, возможно получить нежелательный побочный продукт с общей лёгкой цепью. Потенциальная возможность для оптимизации этого варианта определяется введением зарядовых замен в константные домены лёгких и тяжёлых цепей первой специфичности. Этот подход предполагает предотвращение образования нежелательных примесей. Простота упомянутого платформенного решения позволяет создавать бивалентные бсАт (с одной специфичностью на валентность, 1+1) и трёх- и четырёхвалентные мсАт [30].

FIT-Ig®. Компания «EpiMab» разработала оригинальную платформу для создания четырёхвалентных бсАт на основе подхода

«CrossMab» — так называемые «Fabs-In-Tandem Immunoglobulin (FIT-Ig)». Здесь константные и переменные домены лёгкой цепи со специфичностью ко второму антигену добавляются к N-концам тяжёлых цепей, уже обладающих специфичностью к первому антигену. Таким образом, данные бсАт состоят из двух канонических лёгких цепей со специфичностью к первому антигену и двух лёгких цепей, содержащих константные и переменные домены тяжёлой цепи со специфичностью ко второму антигену. Благодаря потенциалу платформы «CrossMab» задача правильной димеризации лёгкой цепи с тяжёлой цепью полностью решена [31, 32].

cLC®. Этот формат структуры бсАт похож на каноническую молекулу иммуноглобулина, но специфичность к двум разным антигенам достигается за счёт разных тяжёлых цепей, гетеродимеризованных с использованием таких мутаций, как «knob-into-hole». Лёгкая цепь здесь подбирается таким образом, чтобы она также была комплементарна к обоим тяжёлым цепям и не приводила к потере функциональной активности или изменениям физико-химических свойств бсАт [33, 34].

Triomab®. В формате «Triomab» бсАт получается путём соматического слияния двух гибридом, каждая из которых экспрессирует уникальное мсАт. Две гибридомы, экспрессирующие антитела, объединяются, и полученная гибридная клетка экспрессирует тяжёлые и лёгкие цепи антител от родительских клеток. Процесс сборки антител позволяет образовывать как родительские, так и гибридные иммуноглобулины. Технология «quadroma» является историческим базисом для получения бсАт, но имеет такие недостатки, как низкая производительность и высокая гетерогенность получаемого продукта. Фактический процент функциональных бсАт в линии клеток квадромы непредсказуем, и в данной ситуации требуется трудоёмкий процесс, связанный с изоляцией бсАт от побочных продуктов. Впоследствии эта технология была усовершенствована путём слияния гибридом мыши и крысы. Содержание химерных бсАт мышь/крыса было значительно выше благодаря преимущественной димеризации тяжёлой и лёгкой цепей, ограниченной видовой принадлежностью, в отличие от случайной димеризации в обычных квадромах типа мышь/мышь или крыса/крыса [35].

Biclonics®. Компания «Merus» использует широко известный формат с общей лёгкой цепью с отличием в том, что вместо популярной мутации «knob-into-hole» они используют собственные мутации для гетеродимеризации

НС — DEKK (L351K, T366K/L351D, L368E) [33]. Так, антитело зенокутузумаб (MCLA-128) было разработано с использованием упомянутой технологии.

HLE-BiTE®. Разработанная компанией «Amgen» платформа «HLE-BiTE» является биспецифическим Т-клеточным энгейджером (BiTE) — классом бсАт, которые задействуют цитотоксические Т-клетки, направляя их на опухолевые. BiTE — это слитый белок, состоящий из двух одноцепочечных переменных фрагментов (scFvs) различных антител. Один из этих фрагментов связывается с Т-клетками, обычно через рецептор CD3, в то время как другой связывается со злокачественными клетками через специфическую для опухоли молекулу. «HLE» в этом формате является аббревиатурой для «Half-Life Extended», что обозначает увеличение времени полувыведения бсАт в организме пациента, которое достигается добавлением Fc-фрагмента к каждой молекуле BiTE.

CRIB. Компания «Alphamab» разработала свою платформу для гетеродимеризации тяжёлых цепей. Основанием для новой платформы под названием «Charge Repulsion Induced Bispecific (CRIB)» выступили мутации «knob-into-hole». После оптимизации этой платформы путём добавления одной аминокислотной замены к каждой тяжёлой цепи доля корректно собранных гетеродимеров увеличилась с 74% до 94% [36].

Симметричные бсАт. Tandem sdAb-Fc®. «Alphamab» активно использует VHH-фрагменты, слитые с Fc-фрагментом человеческого IgG, для разработки антител. Для получения бсАт использовали слияние двух VHH-фрагментов, и полученный димер был непосредственно связан с Fc-фрагментом. В результате гомодимеризации Fc-фрагментов можно получить тетравалентное бсАт с двумя валентностями (к одной мишени).

TETRABODY — ITAB®. Компания «Akesobio» разработала передовую платформу под названием «Tetrabody», которая основана на добавлении scFv, специфичного для второй цепи, к C-концу каждой тяжёлой цепи. Эта манипуляция приводит к получению молекулы с четырьмя связывающими сайтами для двух мишеней.

DVD-Ig®. Формат «Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig)» был описан в 2007 г. [37, 38]. Эта четырёхвалентная молекула состоит из двух тяжёлых цепей и двух лёгких, имеет функциональный Fc-регион и константные домены в конфигурации, аналогичной каноническому IgG. Однако каждое плечо молекулы содержит два переменных домена

(VD) в тяжёлых и лёгких цепях, соединённых линкерными последовательностями. Как и формат Tetrabody, DVD-Ig является тетравалентным антителом, способным взаимодействовать двумя связывающими сайтами с каждой из двух мишеней. Антитело DVD-Ig можно сконструировать, соединив последовательно переменный домен любой пары антител. Оно может состоять из полностью человеческих последовательностей, что уменьшает потенциальную иммуногенность и позволяет сохранять стабильность в сыворотке крови, как обычный IgG. Утверждается, что антитело DVD-Ig можно эффективно производить с использованием стандартных систем экспрессии млекопитающих, и оно обладает физико-химическими свойствами, сравнимыми с обычным IgG, несмотря на его увеличенный размер и нестандартную структуру.

IgG + TGFβ-receptor. Этот формат также похож на формат Tetrabody за исключением того, что вместо использования фрагмента scFv для второй специфичности к антителу, взаимодействующему с PDL1, добавляется связывающий домен TGF-βRII, способный взаимодействовать с тремя изоформами TGF-β.

БсАт на основе фрагментов. TriTAC®. «Tri-specific T-cell Activating Construct (TriTAC)» — это новый формат Т-клеточного энгейджера, разработанный «Harpoon Therapeutics». Этот новый класс иммунотерапии на основе Т-клеток направлен на достижение более высокой эффективности в терапии солидных опухолей по сравнению с таким золотым стандартом, как Т-клеточная терапия. БсАт формата «TriTAC» состоит из трёх антиген-связывающих доменов, один из которых связывается с альбумином, необходимым для увеличения периода полувыведения молекул в сыворотке. Антитела «TriTAC» имеют молекулярный вес около 53 кДа, что делает их меньше большинства форматов Т-клеточных энгейджеров. Одно из главных преимуществ этих антител заключается в том, что их маленький размер обеспечивает более быстрое распространение в тканях солидных опухолей [39].

ImmTAC®. Молекула ImmTAC® представляет собой слитый белок, состоящий из рекомбинантного рецептора Т-клеток (TCR), соединённого через линкер с одноцепочечным переменным фрагментом антитела scFv. Он взаимодействует с CD3 и активирует поликлональные Т-клетки для высвобождения провоспалительных цитокинов и цитолитических белков, что приводит к прямому лизису опухолевых клеток. Существенное отличие от канонических бсАт или слитых антиген-

связывающих фрагментов заключается в том, что молекулы этого формата используют TCR для взаимодействия с опухолевыми антигенами. В то время как антитела могут взаимодействовать только с антигенами на поверхности клетки или с секретируемыми молекулами, CR могут распознавать пептиды, которые являются фрагментами внутриклеточных мишеней, представленными в составе молекул человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) [40, 41].

ЭКСПРЕССИОННЫЕ СИСТЕМЫ И ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ

Спрос на высокопроизводительные экспрессионные системы растёт по мере увеличения числа новых биопродуктов и биоаналогов. Выбор гетерологичной системы экспрессии тесно связан с экономическими предпосылками (например, выход целевого белка и затраты на получение продукта), а также с биохимическими и биофизическими свойствами конечного продукта (например, число цепей в молекуле белка, характер гликозилирования) и с характеристиками самого биопроцесса.

Относительно простые белки, такие как слитые фрагменты антител, состоящие из одной полипептидной цепи, могут быть получены с помощью прокариотических систем, например, *Escherichia coli* [42]. В случае более сложных белков на основе полноразмерных антител, состоящих из нескольких полипептидных цепей, широко используются эукариотические системы, как правило, клеточные линии млекопитающих [43]. Эти системы могут предоставить производителям необходимые профили фолдинга и посттрансляционных модификаций (ПТМ) белков в соответствии с человеческими биохимическими путями. Кроме того, экспрессионные системы на основе клеток млекопитающих могут быть использованы в крупномасштабном производстве и способны синтезировать большие объёмы терапевтических антител [44]. В данном разделе статьи мы рассмотрим такие гетерологичные экспрессионные системы для получения бсАт, которые уже продемонстрировали отличную эффективность в промышленном производстве.

Прокариотические клетки (*E. coli*). Штаммы *E. coli* являются широко используемой экспрессионной системой для получения рекомбинантных белков. Эта бактерия обладает рядом преимуществ для производства белковых молекул, включая высокие уровни экспрессии,

экономичность, быстрый рост и масштабируемость. На основе *E. coli* получено множество рекомбинантных терапевтических белков, включая антитела, цитокины и гормоны роста. Антитела могут быть получены в *E. coli* в различных форматах, включая scFvs, Fab-фрагменты и даже полноразмерные антитела. Однако получение полноразмерных антител может быть затруднено из-за сложности этих молекул и необходимости их правильной сборки и фолдинга [45].

Производство бсАт в *E. coli* также возможно, но может быть ещё более сложным, чем производство моноспецифических антител, из-за сложной структуры данных молекул и необходимости сохранения естественной структуры антитела. Поэтому, согласно недавнему исследованию [42], только некоторые фрагменты антител и слитые белки, полученные на базе экспрессионной системы *E. coli*, были одобрены в качестве терапевтических средств для лечения различных заболеваний; полноразмерные мкАт или бсАт, полученные с помощью *E. coli*, на данный момент не были клинически апробированы.

Однако последние достижения в области белковой инженерии и экспрессионных систем позволили получать бсАт в *E. coli* с применением различных подходов, используя разные форматы белков. Один из подходов к получению бсАт в *E. coli* предполагает использование фрагментов белков, таких как BiTE или триспецифические киллерные энгейджеры (TriKEs). Эти форматы состоят из небольших фрагментов, которые могут быть получены в *E. coli* и соединены в бсАт или триспецифические антитела. В настоящее время известно, что одним из терапевтических препаратов, полученных с использованием системы *E. coli* и одобренных для лечения рака, является тебентафусп — новый формат иммунотерапии на основе платформы ImmTAC®. Он включает в себя растворимый TCR, слитый с одноцепочечным вариабельным анти-CD3 фрагментом. Домен TCR Tebentafusp таргетирует клетки, на поверхности которых представлен HLA-A*02:01 в комплексе с меланома-ассоциированным антигеном gp100 [46]. Данное бсАт получено в виде телец включения и требует сложных процедур рефолдинга.

Известен случай синтеза бсАт в *E. coli* для молекулы, состоящей из обычного Fab-фрагмента, нацеленного на CD3, и VHH, нацеленного на HER2. Очищенное антитело способно вызывать опосредованную Т-клетками цитотоксичность против HER2-положительных клеток как *in vitro*, так и *in vivo*. Авторы предпо-

лагают, что с помощью этого подхода можно эффективно получать бсАт, направленные на другие опухолевые антигены [47].

Другой подход к рекомбинантному получению бсАт в *E. coli* предполагает совместную экспрессию двух полуантител, каждое из которых состоит из НС и LC. Эти полуантитела могут спонтанно собираться в интактную молекулу бсАт с естественной архитектурой антигена [48]. Данный метод получения бсАт подразумевает совместное культивирование двух штаммов бактерий, каждый из которых экспрессирует своё полуантитело. С использованием этого подхода было получено 28 различных бсАт. Одно из этих антител, нацеленное на тирозинкиназы рецепторов MET и EGFR, ингибирует их сигналы и подавляет рост опухолевых клеток. Данный метод позволяет быстро и недорого получать бсАт из любых двух существующих антител в количествах, необходимых для ранней разработки и доклинических исследований.

Производство как моноспецифических антител, так и бсАт в *E. coli* по-прежнему сопряжено с определёнными трудностями, связанными с потенциально необратимой агрегацией или деградацией экспрессируемых белков и отсутствием некоторых ПТМ [49]. Несмотря на эти трудности, *E. coli* остаётся привлекательной экспрессионной системой для гетерологического производства бсАт благодаря высоким уровням экспрессии и масштабируемости. Крупномасштабное производство бсАт в *E. coli* возможно при использовании технологии ферментации, которая позволяет выращивать клетки с высокой плотностью и получать большие количества рекомбинантных белков [50].

Эукариотические клетки (СНО). Система экспрессии в клетках яичников китайского хомячка (СНО) широко используется для получения рекомбинантных белков, в частности канонических мкАт [51]. Клетки СНО являются наиболее привлекательной системой благодаря стабильной клеточной пролиферации, эффективной ПТМ и устоявшимся стандартам надлежащей производственной практики (GMP). Эти клетки были всесторонне изучены и оптимизированы для производства белков, что делает их надёжной и эффективной платформой для крупномасштабного производства. Важной характеристикой клеточной линии является производительность. На ранних стадиях разработки из-за своей простоты и скорости используются транзистентные экспрессионные системы. На более поздних стадиях разработки необходимо получить стабильную клеточную линию, способную продуцировать антитело

с неизменным качеством. Клетки СНО используются в качестве клеточной линии-продуцента для более 50% существующих биотехнологических препаратов [52].

В 1957 г. Теодор Пак выделил из ткани яичника китайского хомячка клетку, которая оказалась бессмертной и превратилась в клеточную линию СНО-ori. Позже, в 1968 г., из неё была получена клеточная линия СНО-K1. Обе клеточные линии выращивались как адгезионные культуры и были малоприспособлены для крупномасштабных процессов. В 1971 г. Томпсон из Университета Торонто создал другую подлинию, известную сейчас как СНО-S, для выращивания в суспензионном формате, что позволило нарабатывать клетки в более крупных масштабах в биореакторах [53].

В настоящее время для производства мкАт преимущественно используется родительская клеточная линия СНО. По состоянию на 2017 г. около 2/3 всех одобренных мкАт были получены в клетках СНО [54]. Аналогичное соотношение сохраняется и для бсАт. По состоянию на 2022 г. девять одобренных бсАт были получены с помощью экспрессионных систем млекопитающих (за исключением катумаксомаба), среди них шесть — в клетках СНО.

Благодаря таким преимуществам, как быстрый рост в суспензионной культуре и высокий выход рекомбинантных белков, эта платформа в настоящее время активно используется для получения бсАт как на стадии ранней разработки, так и в промышленном производстве. Кроме того, клетки СНО могут осуществлять ПТМ, такие как гликозилирование, которые важны для функционирования и стабильности многих рекомбинантных белков. Также некоторые исследования показали, что одни и те же белки, в частности бсАт, полученные в клетках *E. coli* и СНО, показывают существенно разные результаты в тестах на функциональную активность [55, 56].

Сложной проблемой при использовании экспрессионной системы млекопитающих (например, клеток СНО и НЕК293) является необходимость использования дорогостоящих производственных платформ и строгих условий культивирования клеток для обеспечения их жизнедеятельности и предотвращения выделения побочных продуктов в процессе производства. Условия культивирования могут существенно влиять на ПТМ и функциональную активность конечного продукта [57]. Для достижения желаемых качественных характеристик клеточных линий необходимо иметь полное представление о параметрах процесса и контролировать их. При внедрении техно-

логий в новую лабораторию или при расширении производства эти коррективы и оптимизации могут оказаться непростыми.

Одной из проблем при получении чистых продуктов бсАт является правильная сборка антитела. Лишь немногие исследования системно изучали стратегии оптимизации клеточных линий СНО, которые могут способствовать дальнейшему увеличению чистоты бсАт, полученных в клетках СНО. Например, рекомендуется экспрессировать НС и ЛС с помощью отдельных векторов, поскольку манипулирование соотношением плазмид является простым и эффективным подходом к оптимизации сборки белков для получения желаемых продуктов. В другом подходе описан метод двухступенчатой селекции пула, который позволяет повысить чистоту экспрессии бсАт с 44,5 до 88,6% [58].

Другой проблемой синтеза бсАт является образование агрегатов, которые повышают риск нежелательной иммуногенности. Данные агрегаты должны быть удалены, что приводит к снижению выхода целевых белков. Согласно полученным данным, нарушение регуляции глутатиона в клетках СНО является причиной агрегации бсАт. Оценивалось образование агрегатов при использовании процессов «fed-batch» и перфузии. В результате перфузионного процесса содержание агрегатов бсАт оказалось значительно ниже, чем при использовании процесса «fed-batch» [59].

В отдельных работах рассматривались подходы к повышению выхода антител в клетках СНО. Одним из таких подходов является генная инженерия клеток с целью достижения сверхэкспрессии генов, участвующих в клеточном цикле. Так, давно известно, что, воздействуя на отдельные стадии клеточного цикла с целью ускорения или замедления скорости роста клеток на разных фазах (G0/G1 или G2/M), можно увеличить выход рекомбинантных белков. Так, достижение сверхэкспрессии генов *CDKL3* и *COX15*, участвующих в регуляции клеточного цикла, приводит к значительному увеличению продукции белка [60].

Альтернативным способом повышения продуктивности может быть нокаут генов, снижающих экспрессию белков клетки-хозяина (БКХ). БКХ могут секретироваться живыми клетками, а также высвобождаться при их гибели. Они сами по себе являются нежелательной примесью, которую необходимо удалять из препарата антител. В соответствующих экспериментах было показано, что нокаут генов нескольких БКХ может приводить к значительному повышению титра антител. Основная

гипотеза заключается в том, что это позволяет использовать ресурсы клеток для усиления экспрессии интересующего гена. Это также позволило добиться большей чистоты конечного препарата антител [61].

На продуктивность клеток можно влиять не только путём целенаправленной регуляции экспрессии генов с помощью генной инженерии. Было показано, что непрерывное культивирование клеток СНО при низких температурах (33 °C) и добавление в культуральную среду бутирата натрия приводит к увеличению продуктивности рекомбинантных белков. Это было связано с остановкой клеточного цикла в фазе G1/G0. Также было показано, что культивирование при низких температурах или с добавлением бутирата натрия приводит к изменениям в клеточном транскриптоме, особенно в отношении регуляции клеточного цикла. В то же время транскриптомы, связанные с клеточным циклом и пролиферацией, различались между культурами клеток, культивируемых при низкой температуре и с добавлением бутирата натрия. Это позволяет предположить, что в таких подходах клеточный цикл регулируется разными механизмами. Предположительно, культивирование при низкой температуре приводит к остановке клеточного цикла р53-зависимым образом. р53 является одним из основных регуляторов клеточного цикла и апоптоза, и его активация приводит к остановке клеточного цикла за счёт активации ряда генов-мишеней р53 (например, *CDKN1A*, *BAX*, *MDM2*). С другой стороны, добавление бутирата натрия приводит к остановке клеточного цикла за счёт модуляции экспрессии и активности циклин-зависимых киназ (CDK) и ингибиторов CDK, которые являются регуляторными белками клеточного цикла, участвующими в переходе G-фазы [62].

Эукариотические клетки (НЕК293). Клетки НЕК293 представляют собой линию, изначально полученную из клеток эмбриональной почки человека. НЕК293 являются ещё одной широко используемой экспрессионной системой для получения рекомбинантных белков. Они обладают рядом преимуществ, в том числе способностью к активной пролиферации и лёгкой трансфекции. Кроме того, поскольку это клетки человеческого происхождения, в них можно получать белки с человекоподобными ПТМ [63].

Профиль гликозилирования белков может быть важным фактором для их использования в качестве биотерапевтических препаратов. Гликопротеины с необходимым профилем гликозилирования могут обладать более

высокой активностью, стабильностью, периодом полураспада и сниженной иммуногенностью. Основное преимущество использования HEK293 в качестве экспрессионной платформы заключается в специфическом требовании к профилю гликозилирования биотерапевтических молекул [64]. Кроме того, было создано множество подтипов и производных этой линии, среди которых HEK293, HEK293-T и HEK293-F часто используются в производстве биофармацевтических препаратов.

Например, HEK293EBNA1 (или 293E) — это подтип клеток HEK293, стабильно экспрессирующих ядерный антиген-1 Эпштейна–Барр (*EBNA1*). При использовании экспрессионных векторов, имеющих точку начала репликации EBV (*oriP*), этот подтип может демонстрировать трёхкратное увеличение выхода рекомбинантных белков по сравнению с аналогичным вектором без *oriP*. Это является одним из основных преимуществ использования клеток HEK293EBNA1 по сравнению с каноническими клетками HEK293 для производства рекомбинантных белков.

Аналогичным образом была создана клеточная линия HEK293-6E, экспрессирующая усечённый EBNA-1, лишённый домена Gly-Gly-Ala. HEK293-6E продемонстрировала более высокую транзientную экспрессию генов и активную пролиферацию клеток по сравнению с HEK293-E [65].

Хотя клетки HEK293F являются клональной клеточной линией, полученной из родительской клеточной линии HEK293 и продаваемой под торговой маркой GIBCO®, эти клетки были адаптированы для выращивания в суспензионной культуре в бессывороточной среде. Клетки HEK293F были использованы для получения нескольких рекомбинантных терапевтических препаратов, одобренных Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA). К ним относятся рекомбинантный слитый белок FVIII (rFVIII-Fc, ELOCTA®) и агонист рецепторов глюкагоноподобного пептида 1 (дулаглутид; TRULICITY®) для лечения гемофилии А и диабета 2-го типа соответственно.

Также существуют клетки, стабильно экспрессирующие биосенсор cAMP GloSensor™ (20F) и полученные компанией «Promega» (Мадисон, США), которые были названы HEK293G [66].

Хорошо известная линия HEK293-T является производной клеточной линии HEK293, созданной путём экспрессии термочувствительного мутантного Т-антигена SV40. Экс-

прессия Т-антигена позволяет плазмидам, несущим точку начала репликации SV40, активно реплицироваться в клетках [67].

Клетки HEK293 также могут быть использованы для крупномасштабного производства антител. Однако масштабирование производства в данной системе сопряжено с определёнными трудностями, включая поддержание высокого уровня экспрессии белка и качества продукта.

Исследования показали, что нокаут гена *CASP8AP2* положительно влияет на производство рекомбинантных белков. *CASP8AP2* кодирует FLICE-ассоциированный большой белок (FLASH). В процессе Fas-опосредованного апоптоза FLASH входит в состав сигнального комплекса, индуцирующего смерть (DISC), который собирается после связывания рецептора смерти Fas с его лигандом FasL. Сборка DISC активирует прокаспазу 8 с образованием протеолитической каспазы 8, которая инициирует апоптотический каскад. FLASH также участвует в созревании гистоновых мРНК и регуляции транскрипции гистоновых генов в S-фазе клеточного цикла, а также в активации транскрипционных факторов cMYB и NF-κB. В клетках HEK293, лишённых *CASP8AP2*, наблюдается семикратное увеличение специфической экспрессии рекомбинантной люциферазы и 2,5-кратное увеличение специфической экспрессии рекомбинантного *SEAP* без существенного влияния на рост и жизнеспособность клеток. Транскриптомный анализ показал, что нарушение регуляции клеточного цикла, в частности активация ингибитора циклин-зависимой киназы 2A (CDKN2A), способствовало повышению экспрессии рекомбинантного белка в клетках с дефицитом *CASP8AP2*. Полученные результаты подтверждают, что ген *CASP8AP2* является важной инженерной мишенью для улучшения экспрессии рекомбинантных белков в клеточной линии HEK293 [68].

Несмотря на сходный с человеком профиль гликозилирования, использование клеток HEK293 для производства терапевтических белков связано с трудностями, обусловленными высоким содержанием в них терминального N-ацетилгалактозамина (GalNAc) и низким уровнем сиалилирования. В терапевтических белках такие N-гликаны часто вызывают быстрый клиренс из кровотока пациента за счёт эффективного связывания с рецептором асиалогликопротеина (ASGP-R) и рецептором маннозы (MR). Однако недавно исследователи разработали новую клеточную линию HEK293F, которая устраняет терминальный GalNAc

и увеличивает сialiлирование путём нокаута GalNAc-трансфераз *B4GALNT3* и *B4GALNT4* и сверхэкспрессии сialiилтрансфераз *ST6GAL1* и *ST3GAL6*. Данная гликоинженерная клеточная линия хорошо подходит для получения терапевтических белков с полностью человеческим N-гликозилированием и отличными фармакокинетическими свойствами [69].

Использование клеток НЕК293 для получения терапевтических препаратов, в том числе бсАт, несколько ограничено. Хотя во многих исследованиях сообщалось о транзientной экспрессии в клетках НЕК293 для получения бсАт [70, 71], для производства биофармацевтических препаратов чаще всего используются стабильные линии клеток СНО. С 2015 г. FDA одобрило семь препаратов, полученных из клеток НЕК. В шести клеточных и генотерапевтических подходах используется клеточная линия НЕК293 или её производные для получения вирусных векторов.

Несмотря на это, многие бсАт, полученные с помощью транзientной экспрессии, в настоящее время находятся на стадии клинической разработки. Это свидетельствует о перспективности использования данной системы экспрессии для получения бсАт. Помимо традиционных методов создания терапевтических бсАт, когда каждый фрагмент проверяется отдельно, а один или несколько лучших вариантов отбираются и объединяются в биспецифический формат, разрабатываются и новые подходы. Один из таких предполагает тестирование различных бсАт в клеточных тестах, в которых могут участвовать до 22 000 кандидатов [72]. В литературе описано, что клетки НЕК293 наиболее подходят для транзientной экспрессии благодаря высоким титрам белка — диапазон титров антител, полученных при экспрессии НЕК293, составляет от десятков до сотен миллиграммов на литр [73–75]. Однако авторы данного обзора не согласны с приведённым описанием, поскольку при транзиторной экспрессии антител клетками СНО удалось получить антитела с титрами не менее 150 мг/л. Этого вполне достаточно для характеристики ведущих кандидатов. Тем не менее задача повышения титров антител как при транзientной экспрессии, так и при производстве стабильных клеточных линий является актуальной. Низкая продуктивность конкретного антитела может стать причиной прекращения дальнейшей разработки.

Также было показано, что транзientная сверхэкспрессия отдельных субъединиц эукариотического фактора трансляции eIF3 (eIF3i и eIF3c) в клетках СНО и НЕК293 приводит

к умеренному увеличению общего количества eIF3i (максимальное увеличение на 40% выше контроля) и примерно 10%-ному увеличению скорости глобального синтеза белка в клетках СНОК1. Модифицированные клетки НЕК293 со сверхэкспрессией eIF3i имели более быстрый рост, связанный с повышенной экспрессией *MYC*, достигали большей биомассы и обеспечивали более высокий выход продукции рекомбинантных белков. Инженерные клетки СНОК1 с eIF3c имели более высокую скорость пролиферации и улучшенный синтез рекомбинантных белков [76].

Таким образом, клетки НЕК293 представляют собой универсальную экспрессионную систему, которая может использоваться для получения рекомбинантных белков, в том числе бсАт. Хотя использование клеток НЕК293 для получения антител сопровождается определёнными трудностями, их преимущества делают их ценным инструментом для исследователей и биотехнологических компаний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре мы представили краткую информацию о форматах бсАт, платформах для их производства и успешных случаях их разработки от исследований до клинических испытаний. Критерием для включения в обзор послужили препараты бсАт, успешно применяемые против солидных опухолей и находящиеся на второй и более поздних фазах клинических испытаний (таблица).

Исходя из уникальных молекулярных особенностей, трудно определить универсальную «волшебную пулю». Тем не менее из множества разнообразных экспрессионных платформ, эукариотических (клетки млекопитающих, растений и насекомых) и прокариотических (*E. coli*, *Bacillus subtilis* и т.д.), в промышленности используются только три клеточные системы гетерологичной продукции. При этом даже при использовании современных платформ для производства антител возможны случаи, когда кандидатные препараты с требуемой биологической активностью обладают неблагоприятными физико-химическими характеристиками. Для бсАт сложной структуры использование прокариотических систем экспрессии нецелесообразно и рискованно. Эти системы весьма ограничены в модификациях, поэтому стоит обратить внимание на альтернативные платформы, более подходящие для усовершенствования системы, такие как эукариотические СНО и НЕК293.

Системы гетерологичной экспрессии и структурные форматы бсАт против солидных опухолей

Тип экспрессионной системы	Экспрессионная клеточная линия	Преимущества	Недостатки	Пример, патентообладатель, этап клинической разработки	Структура бсАт
Эукариоты	CHO	устойчивый рост клеток; эффективная и корректная ПТМ; устойчивые стандарты GMP; корректная сборка; правильное гликозилирование; высокое качество и выход продукта	высокая стоимость; высокий риск заражения вирусами; медленный рост и низкая продуктивность; нестабильная клеточная линия; большие сроки производства; комплексная технология	HPN424, «Niproon Therapeutics» досрочное прекращение: рак простаты (фаза I/II)	бсАт на основе фрагментов антител «TriTac»
				Занидатамаб, «Zymeworks» фаза III: рак пищевода фаза II: билиарный рак, колоректальный рак, рак эндометрия, рак желудка, HER2-положительный рак молочной железы фаза I/II: солидные опухоли	асимметричное бсАт «Azumetric»
				Нависизумаб, «Mercko Bio Pharma»/«OncoXerna Therapeutics» фаза II: рак молочной железы, колоректальный рак, рак фаллопиевых труб, рак желудка, рак яичников, перитониальный рак	симметричное бсАт «cLC»
	HEK293	устойчивый рост клеток; лёгкая трансфекция; эффективная ПТМ; устойчивые стандарты GMP; корректная сборка; правильное гликозилирование; высокое качество и выход продукта	высокая стоимость; медленный рост и низкая продуктивность; нестабильные клеточные линии; длинные сроки производства; комплексная технология; риск контаминации патогенными вирусами человека; дополнительный анализ для проверки на безопасность; сложности на этапе получения регистрационного одобрения (FDA, EMA); отсутствие метаболических селективных маркеров (GS, DHFR); необходимость использования антибиотиков	Эрфонрилимаб, «Alphamab» фаза III: немелкоклеточный рак лёгкого, рак поджелудочной железы фаза II/III: злокачественная тимомы фаза II: рак желудка, рак печени, рак пищевода, солидные опухоли фаза I/II: трижды негативный рак молочной железы	симметричное бсАт «Tandem sdAb-Fc»
				Ретлирафусп альфа, «Jiangsu Hengrui Medicine» фаза III: рак шейки матки, рак желудка, немелкоклеточный рак лёгкого, рак пищевода фаза II/III: колоректальный рак фаза II: билиарный рак, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки, плоскоклеточный рак фаза I/II: солидные опухоли	симметричное бсАт IgG + TGFβ receptor
	HEK293 EBNA			Цибисатамаб, «Roche» фаза I/II: немелкоклеточный рак лёгкого фаза I: колоректальный рак, солидные опухоли RG 7827, «Roche Innovation Center Zurich» фаза I/II: колоректальный рак, уротенитальный рак фаза I: солидные опухоли RG 6232, «Roche» фаза I: злокачественная меланома, увеальная меланома	асимметричное бсАт «CrossMab» асимметричное бсАт «CrossMab» асимметричное бсАт «CrossMab»

Таблица (продолжение)

Тип экспрессионной системы	Экспрессионная клеточная линия	Преимущества	Недостатки		Пример, патентообладатель, этап клинической разработки	Структура бсАг
Эукариоты	HEK293E	устойчивый рост клеток; лёгкая трансфекция; эффективная ПТМ; устоявшиеся стандарты GMP; корректная сборка; правильное гликозилирование; высокое качество и выход продукта	высокая стоимость; медленный рост и низкая продуктивность; нестабильные клеточные линии; долгие сроки производства; комплексная технология; риск контаминации патогенными вирусами человека; дополнительный анализ для проверки на безопасность; сложности на этапе получения регистрационного одобрения (FDA, EMA); отсутствие метаболитических селективных маркеров (GS, DHFR); необходимость использования антибиотиков		Вудалимаб, «Хепсог» фаза II: билиарный рак, гинекологический рак, рак простаты, уrogenитальный рак	асимметричное бсАг «CrossMab»
					Бафизонтмаб, «ErimAb Biotherapeutics» фаза I/II: рак желудочно-кишечного тракта, немелкоклеточный рак легкого, солидные опухоли	симметричное бсАг «CrossMab»
	HEK293F				Ивонесцимаб, «Akeso Biopharma» фаза III: немелкоклеточный рак лёгкого фаза II: колоректальный рак, гинекологический рак, трижды негативный рак молочной железы фаза I/II: рак яичников, солидные опухоли фаза I: мелкоклеточный рак лёгкого	симметричное бсАг «IgG-ScFv»
					Калонилимаб, «Akeso Biopharma» на рынке: рак шейки матки фаза III: рак желудка, рак печени, рак пищевода фаза II: рак носоглотки, немелкоклеточный рак лёгкого, карцинома почек, солидные опухоли фаза I/II: злокачественная меланома, периферическая Т-клеточная лимфома, мелкоклеточный рак лёгкого	симметричное бсАг «ITab»
					RO 7121661, «Roche» фаза II: рак пищевода	симметричное бсАг «CrossMab»
					Вануцизумаб, «Roche»	симметричное бсАг «CrossMab»
					RO 7247669, «Roche» фаза II: немелкоклеточный рак лёгкого, рак пищевода, уrogenитальный рак фаза I/II: злокачественная меланома фаза I: солидные опухоли	симметричное бсАг «CrossMab»
					RO 7300490, «Roche» фаза I: солидные опухоли	асимметричное бсАг «CrossMab»
					Зенокутузумаб, «Merus» фаза II: рак молочной железы, немелкоклеточный рак лёгкого, рак простаты фаза I/II: солидные опухоли	асимметричное бсАг «CrossMab»

Таблица (продолжение)

Тип экспрессионной системы	Экспрессионная клеточная линия	Преимущества	Недостатки	Пример, патентообладатель, этап клинической разработки	Структура бсАт
Эукариоты	HEK293G		высокая стоимость; медленный рост и низкая продуктивность; нестабильные клеточные линии; долгие сроки производства; комплексная технология; риск контаминации патогенными вирусами человека; дополнительный анализ для проверки на безопасность; сложности на этапе получения регистрационного одобрения (FDA, EMA); отсутствие метаболических селективных маркеров (GS, DHFR); необходимость использования антибиотиков	Дилацимаб, «AbbVie» фаза II: колоректальный рак фаза I: солидные опухоли	симметричное бсАт «DVD-Ig»
Прокариоты	<i>E. coli</i>	высокая экономичность; быстрое получение белка; высокая скорость роста клеток, масштабируемость; хорошо охарактеризованные штаммы; хорошая масштабируемость; присутствие регуляторных элементов; высокая экспрессия	отсутствие машинерии для удаления интронов; отсутствие ПТМ; значительные ошибки в фолдинге белка; нечеловеческое гликозилирование; накопление эндотоксинов; смещение кодонов	Тебентафусл, «Immunoscape» на рынке: увеальная меланома фаза II/III: злокачественная меланома	бсАт на основе фрагментов антител

Грамотная оптимизация и инженерия биохимических путей, использование различных производных клеточных линий, углубление в их транскриптомные и геномные профили, возможно, позволят повысить эффективность производства белков. Настройка выбранной платформы на требуемый выход продукта — это перспективное направление в области систем для гетерологичной экспрессии [77, 78].

Перечисленные выше подходы, представленные множеством различных форматов бсАт и несколькими дополнительными экспрессионными системами, такими как *B. subtilis*, *Streptomyces*, дрожжи, трансгенные растения, трансгенные животные, клетки насекомых, к сожалению, пока неэффективны для получения больших количеств рекомбинантных белков и редко используются для производства антител [79].

Однако среди перспективных, но малоизвестных с точки зрения коммерческого потенциала применения существует платформа, которая может стать прорывом в сфере получения белков, в частности бсАт. Это система бесклеточного синтеза белков (СБСБ), популяризированная в основном компанией «Sutro Biopharma, Inc.» (США). Она стала важна для синтетической биологии [80–87] не только как платформа для отбора и прямой эволюции полипептидов из больших библиотек, но и как ценный инструмент для структурной и функциональной характеристики интегральных мембранных белков [85, 88] и различных форматов мкАт и бсАт. Данный тип экспрессионных систем основан на экстракте прокариотических или эукариотических клеток, включающем рибосомы, факторы трансляции, аминоацил-тРНК-синтетазу и дополненном подходящей экзогенной линейной или кольцевой ДНК-матрицей, аминокислотами, тРНК, dNTPs, АТР, системой регенерации клетки и другими необходимыми факторами [82, 89, 90]. Прокариотические и эукариотические системы бесклеточной экспрессии всё чаще используются для получения фрагментов [88, 91] и полноразмерных [92] антител даже против сложных трансмембранных антигенов, таких как рецепторы, связанные с G-белками [93, 94], и внеклеточных областей других полиопных интегральных мембранных белков [89].

Системы СБСБ заслуживают внимания по целому ряду причин. Несмотря на то, что в их основе — лизаты различных про- или эукариотических клеток, что позволяет избежать проблем «клеточных» систем, бесклеточные системы синтеза имеют некоторые ограничения, зависящие от того, насколько конкретная систе-

ма подходит для получения выбранного белка, но разнообразие существующих платформ и подходов позволяет преодолевать возможные препятствия. Бесклеточные системы используют в основном два популярных формата: «в объёме» и непрерывный бесклеточный синтез. Последний предполагает относительно стабильную подачу свежих компонентов в реакционную камеру, что увеличивает время синтеза и, следовательно, повышает выход белка. Благодаря широкому спектру применения бесклеточных систем их преимущества могут быть использованы в различных областях — от инженерии антител до производства вакцин.

Несмотря на преимущества бесклеточной системы с точки зрения открытости и гибкости, одним из краеугольных камней на сегодняшний день остаётся экономическая целесообразность, и здесь бесклеточная система требует определённых доработок, чтобы в будущем стать более конкурентоспособной на рынке производства антител. В рамках тематического исследования была проведена оценка группы параметров, определяющих экономическую целесообразность применения бесклеточной системы на основе экстракта бактериальных клеток по сравнению с привычной СНО-платформой для производства коммерческих белков. Согласно проведённому анализу, себестоимость продукта, произведённого на бесклеточной платформе, значительно выше, чем на СНО-платформе, причём основной статьёй расходов являлся вышеупомянутый бактериальный экстракт. Тем не менее в долгосрочной перспективе бесклеточные системы предлагают больше преимуществ [95].

В целом, эукариотические бесклеточные системы позволяют получать белки, подходящие как для прямого функционального анализа, так и, при соответствующей настройке, для промышленных или терапевтических нужд. Это позволяет проводить быстрый скрининг, разделять процессы и экономить время при получении как обычных, так и трудносинтезируемых белков. Бесклеточные системы более гибки и восприимчивы к модификациям, как и белки, получаемые с их помощью, что является важным свойством, ценным для разработчиков биологических препаратов. Это открывает путь к крупномасштабному производству белков [96, 97].

Примером успешной коммерческой бесклеточной платформы является технология «XpressCF+™». Это быстрая, точная и высокоэффективная система, способная производи-

ровать отвечающий всем необходимым требованиям препарат бсАт менее чем за сутки. Существовавшая ранее проблема надлежащего источника энергии для производства белка была решена путём изготовления экстракта на основе *E. coli*, содержащего необходимые элементы в нужной форме, что позволило повысить общее качество системы. Указанная платформа позволяет легче встраивать неприродные аминокислоты (nnAA) и конъюгированные вещества, преодолевая гетерогенность и создавая сложный, корректно собранный продукт. На сегодняшний день компания «Sutro» имеет в своём портфеле четыре препарата конъюгированных антител и бсАт, созданных с помощью вышеупомянутой системы, и продолжает расширять своё влияние, сотрудничая с различными компаниями [98, 99].

В конечном счёте, каждая платформа и формат имеют свои достоинства и недостатки, и выбор одной из них должен зависеть от целей и задач, стоящих перед исследователем в академической науке или промышленности.

Вклад авторов. А.К. Мисорин — анализ и обобщение данных, написание рукописи; Д.А. Чернышова — редактирование рукописи и написание заключительного раздела; М.С. Карбышев — обобщение данных, руководство, редактирование рукописи.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю благодарность д-ру Айше К. Лаггерре («Roche», США) за ценные замечания и корректуру рукописи. Также авторы благодарят Нисканена С.А., Кокинос Е.К. и Баскакову К.О. за ценное обсуждение рукописи.

Финансирование. При написании данного обзора не было использовано никаких источников финансирования.

Конфликт интересов. А.К. Мисорин, Д.О. Чернышова и М.С. Карбышев являются штатными сотрудниками АО «Биокад», занимающегося разработкой терапевтических антител к сложным мембранным белкам-мишеням для лечения различных заболеваний.

Соблюдение этических норм. В данной статье отсутствуют исследования с участием людей и животных, выполненные авторами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fougner, C., Cannon, J., The, L., Smith, J. F., and Leclerc, O. (2023) Herding in the drug development pipeline, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **22**, 617-618, doi: 10.1038/d41573-023-00063-3.
2. Vargason, A. M., Anselmo, A. C., and Mitragotri, S. (2021) The evolution of commercial drug delivery technologies, *Nat. Biomed. Eng.*, **5**, 951-967, doi: 10.1038/s41551-021-00698-w.
3. Wang, Z., Wang, G., Lu, H., Li, H., Tang, M., and Tong, A. (2022) Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases, *Mol. Biomed.*, **3**, 35, doi: 10.1186/s43556-022-00100-4.
4. Bayer, V. (2019) An overview of monoclonal antibodies, *Semin. Oncol. Nurs.*, **35**, 150927, doi: 10.1016/j.soncn.2019.08.006.
5. Mach, J. P. (2017) Recombinant monoclonal antibodies, from tumor targeting to cancer immunotherapy: a critical overview [in Russian], *Mol. Biol. (Mosk.)*, **51**, 1024-1038, doi: 10.7868/S0026898417060131.
6. Jin, H., Wang, L., and Bernards, R. (2023) Rational combinations of targeted cancer therapies: background, advances and challenges, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **22**, 213-234, doi: 10.1038/s41573-022-00615-z.
7. Schmidt, G., Guhl, M. M., Solomayer, E. F., Wagenpfeil, G., Hammadeh, M. E., Juhasz-Boess, I., Endrikat, J., Kasoha, M., and Bohle, R. M. (2022) Immunohistochemical assessment of PD-L1 expression using three different monoclonal antibodies in triple negative breast cancer patients, *Arch. Gynecol. Obstet.*, **306**, 1689-1695, doi: 10.1007/s00404-022-06529-w.
8. Karbyshev, M. S., Grigoryeva, E. S., Volkomorov, V. V., Kremmer, E., Huber, A., Mitrofanova, I. V., Kaigorodova, E. V., Zavyalova, M. V., Kzhyshkowska, J. G., Cherdyntseva, N. V., and Choynzonov, E. L. (2018) Development of novel monoclonal antibodies for evaluation of transmembrane prostate androgen-induced protein 1 (TMEPAI) expression patterns in gastric cancer, *Pathol. Oncol. Res.*, **24**, 427-438, doi: 10.1007/s12253-017-0247-x.
9. Parakh, S., Lee, S. T., Gan, H. K., and Scott, A. M. (2022) Radiolabeled antibodies for cancer imaging and therapy, *Cancers (Basel)*, **14**, 1454, doi: 10.3390/cancers14061454.
10. Wei, W., Rosenkrans, Z. T., Liu, J., Huang, G., Luo, Q. Y., and Cai, W. (2020) ImmunoPET: concept, design, and applications, *Chem. Rev.*, **120**, 3787-3851, doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00738.
11. Goulet, D. R., and Atkins, W. M. (2020) Considerations for the design of antibody-based therapeutics, *J. Pharm. Sci.*, **109**, 74-103, doi: 10.1016/j.xphs.2019.05.031.
12. Chiu, M. L., Goulet, D. R., Teplyakov, A., and Gilliland, G. L. (2019) Antibody structure and function: the basis for engineering therapeutics, *Antibodies (Basel)*, **8**, 55, doi: 10.3390/antib8040055.

13. Elshiaty, M., Schindler, H., and Christopoulos, P. (2021) Principles and current clinical landscape of multispecific antibodies against cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 5632, doi: 10.3390/ijms22115632.
14. Ma, J., Mo, Y., Tang, M., Shen, J., Qi, Y., Zhao, W., Huang, Y., Xu, Y., and Qian, C. (2021) Bispecific antibodies: from research to clinical application, *Front. Immunol.*, **12**, 626616, doi: 10.3389/fimmu.2021.626616.
15. Husain, B., and Ellerman, D. (2018) Expanding the boundaries of biotherapeutics with bispecific antibodies, *BioDrugs*, **32**, 441-464, doi: 10.1007/s40259-018-0299-9.
16. Gera, N. (2022) The evolution of bispecific antibodies, *Expert. Opin. Biol. Ther.*, **22**, 945-949, doi: 10.1080/14712598.2022.2040987.
17. Du, Y., and Xu, J. (2021) Engineered bifunctional proteins for targeted cancer therapy: prospects and challenges, *Adv. Mater.*, **33**, e2103114, doi: 10.1002/adma.202103114.
18. Chen, S. W., and Zhang, W. (2021) Current trends and challenges in the downstream purification of bispecific antibodies, *Antib. Ther.*, **4**, 73-88, doi: 10.1093/abt/tba007.
19. Tripathi, N. K., and Shrivastava, A. (2019) Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **7**, 420, doi: 10.3389/fbioe.2019.00420.
20. Kunert, R., and Reinhart, D. (2016) Advances in recombinant antibody manufacturing, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 3451-3461, doi: 10.1007/s00253-016-7388-9.
21. Blanco, B., Dominguez-Alonso, C., and Alvarez-Vallina, L. (2021) Bispecific immunomodulatory antibodies for cancer immunotherapy, *Clin. Cancer Res.*, **27**, 5457-5464, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3770.
22. Labrijn, A. F., Janmaat, M. L., Reichert, J. M., and Parren, P. (2019) Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **18**, 585-608, doi: 10.1038/s41573-019-0028-1.
23. Muller, D., Karle, A., Meissburger, B., Hofig, I., Stork, R., and Kontermann, R. E. (2007) Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin, *J. Biol. Chem.*, **282**, 12650-12660, doi: 10.1074/jbc.M700820200.
24. Bern, M., Nilsen, J., Ferrarese, M., Sand, K. M. K., Gjolberg, T. T., Lode, H. E., Davidson, R. J., Camire, R. M., Baekkevold, E. S., Foss, S., Grevys, A., Dalhus, B., Wilson, J., Hoydahl, L. S., Christianson, G. J., Roopenian, D. C., Schlothauer, T., Michaelsen, T. E., Moe, M. C., Lombardi, S., et al. (2020) An engineered human albumin enhances half-life and transmucosal delivery when fused to protein-based biologics, *Sci. Transl. Med.*, **12**, eabb0580, doi: 10.1126/scitranslmed.abb0580.
25. Zhang, J., Yi, J., and Zhou, P. (2020) Development of bispecific antibodies in China: overview and prospects, *Antib. Ther.*, **3**, 126-145, doi: 10.1093/abt/tbaa011.
26. Klein, C., Sustmann, C., Thomas, M., Stubenrauch, K., Croasdale, R., Schanzer, J., Brinkmann, U., Kettenberger, H., Regula, J. T., and Schaefer, W. (2012) Progress in overcoming the chain association issue in bispecific heterodimeric IgG antibodies, *mAbs*, **4**, 653-663, doi: 10.4161/mabs.21379.
27. Moore, G. L., Bernett, M. J., Rashid, R., Pong, E. W., Nguyen, D. T., Jacinto, J., Eivazi, A., Nisthal, A., Diaz, J. E., Chu, S. Y., Muchhal, U. S., and Desjarlais, J. R. (2019) A robust heterodimeric Fc platform engineered for efficient development of bispecific antibodies of multiple formats, *Methods*, **154**, 38-50, doi: 10.1016/j.ymeth.2018.10.006.
28. Moore, G. L., Bautista, C., Pong, E., Nguyen, D. H., Jacinto, J., Eivazi, A., Muchhal, U. S., Karki, S., Chu, S. Y., and Lazar, G. A. (2011) A novel bispecific antibody format enables simultaneous bivalent and monovalent co-engagement of distinct target antigens, *mAbs*, **3**, 546-557, doi: 10.4161/mabs.3.6.18123.
29. Merchant, A. M., Zhu, Z., Yuan, J. Q., Goddard, A., Adams, C. W., Presta, L. G., and Carter, P. (1998) An efficient route to human bispecific IgG, *Nat. Biotechnol.*, **16**, 677-681, doi: 10.1038/nbt0798-677.
30. Surowka, M., Schaefer, W., and Klein, C. (2021) Ten years in the making: application of CrossMab technology for the development of therapeutic bispecific antibodies and antibody fusion proteins, *mAbs*, **13**, 1967714, doi: 10.1080/19420862.2021.1967714.
31. Gong, S., and Wu, C. (2019) Generation of Fabs-in-tandem immunoglobulin molecules for dual-specific targeting, *Methods*, **154**, 87-92, doi: 10.1016/j.ymeth.2018.07.014.
32. Gong, S., Ren, F., Wu, D., Wu, X., and Wu, C. (2017) Fabs-in-tandem immunoglobulin is a novel and versatile bispecific design for engaging multiple therapeutic targets, *mAbs*, **9**, 1118-1128, doi: 10.1080/19420862.2017.1345401.
33. De Nardis, C., Hendriks, L. J. A., Poirier, E., Arvinte, T., Gros, P., Bakker, A. B. H., and de Kruif, J. (2017) A new approach for generating bispecific antibodies based on a common light chain format and the stable architecture of human immunoglobulin G(1), *J. Biol. Chem.*, **292**, 14706-14717, doi: 10.1074/jbc.M117.793497.
34. Klein, C., Moessner, E., Hosse, R., Bruenker, P., Umana, P., and Neumann, C. (2017) *Common Light Chains and Methods of Use*, Hoffmann La Roche Inc., USA.
35. Wu, Y., Yi, M., Zhu, S., Wang, H., and Wu, K. (2021) Recent advances and challenges of bispecific antibodies in solid tumors, *Exp. Hematol. Oncol.*, **10**, 56, doi: 10.1186/s40164-021-00250-1.
36. Wei, H., Cai, H., Jin, Y., Wang, P., Zhang, Q., Lin, Y., Wang, W., Cheng, J., Zeng, N., Xu, T., and Zhou, A.

- (2017) Structural basis of a novel heterodimeric Fc for bispecific antibody production, *Oncotarget*, **8**, 51037-51049, doi: 10.18632/oncotarget.17558.
37. Wu, C., Ying, H., Grinnell, C., Bryant, S., Miller, R., Clabbers, A., Bose, S., McCarthy, D., Zhu, R. R., Santora, L., Davis-Taber, R., Kunes, Y., Fung, E., Schwartz, A., Sakorafas, P., Gu, J., Tarcsa, E., Murtaza, A., and Ghayur, T. (2007) Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin, *Nat. Biotechnol.*, **25**, 1290-1297, doi: 10.1038/nbt1345.
 38. DiGiammarino, E., Ghayur, T., and Liu, J. (2012) Design and generation of DVD-Ig molecules for dual-specific targeting, *Methods Mol. Biol.*, **899**, 145-156, doi: 10.1007/978-1-61779-921-1_9.
 39. Wesche, H., Aaron, W., Austin, R. J., Baeuerle, P. A., Jones, A., Lemon, B., Sexton, K., and Yu, T. (2018) Abstract 3814: TriTACs are novel T cell-engaging therapeutic proteins optimized for the treatment of solid tumors and for long serum half-life, *Cancer Res.*, **78**, 3814-3814, doi: 10.1158/1538-7445.Am2018-3814.
 40. Oates, J., Hassan, N. J., and Jakobsen, B. K. (2015) ImmTACs for targeted cancer therapy: Why, what, how, and which, *Mol. Immunol.*, **67**, 67-74, doi: 10.1016/j.molimm.2015.01.024.
 41. Holland, C. J., Crean, R. M., Pentier, J. M., de Wet, B., Lloyd, A., Srikanthasani, V., Lissin, N., Lloyd, K. A., Blicher, T. H., Conroy, P. J., Hock, M., Pengelly, R. J., Spinner, T. E., Cameron, B., Potter, E. A., Jeyanthan, A., Molloy, P. E., Sami, M., Aleksic, M., Liddy, N., et al. (2020) Specificity of bispecific T cell receptors and antibodies targeting peptide-HLA, *J. Clin. Invest.*, **130**, 2673-2688, doi: 10.1172/JCI130562.
 42. Rashid, M. H. (2022) Full-length recombinant antibodies from *Escherichia coli*: production, characterization, effector function (Fc) engineering, and clinical evaluation, *mAbs*, **14**, 2111748, doi: 10.1080/19420862.2022.2111748.
 43. Lalonde, M. E., and Durocher, Y. (2017) Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells, *J. Biotechnol.*, **251**, 128-140, doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.04.028.
 44. Dangi, A. K., Sinha, R., Dwivedi, S., Gupta, S. K., and Shukla, P. (2018) Cell line techniques and gene editing tools for antibody production: a review, *Front. Pharmacol.*, **9**, 630, doi: 10.3389/fphar.2018.00630.
 45. Sandomenico, A., Sivaccumar, J. P., and Ruvo, M. (2020) Evolution of *Escherichia coli* expression system in producing antibody recombinant fragments, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6324, doi: 10.3390/ijms21176324.
 46. Damato, B. E., Dukes, J., Goodall, H., and Carvajal, R. D. (2019) Tebentafusp: T cell redirection for the treatment of metastatic uveal melanoma, *Cancers (Basel)*, **11**, 971, doi: 10.3390/cancers11070971.
 47. Lin, L., Li, L., Zhou, C., Li, J., Liu, J., Shu, R., Dong, B., Li, Q., and Wang, Z. (2018) A HER2 bispecific antibody can be efficiently expressed in *Escherichia coli* with potent cytotoxicity, *Oncol. Lett.*, **16**, 1259-1266, doi: 10.3892/ol.2018.8698.
 48. Spiess, C., Merchant, M., Huang, A., Zheng, Z., Yang, N. Y., Peng, J., Ellerman, D., Shatz, W., Reilly, D., Yansura, D. G., and Scheer, J. M. (2013) Bispecific antibodies with natural architecture produced by co-culture of bacteria expressing two distinct half-antibodies, *Nat. Biotechnol.*, **31**, 753-758, doi: 10.1038/nbt.2621.
 49. Patil, R. S., Anupa, A., Gupta, J. A., and Rathore, A. S. (2022) Challenges in expression and purification of functional Fab fragments in *E. coli*: current strategies and perspectives, *Fermentation*, **8**, 175, doi: 10.3390/fermentation8040175.
 50. Baumgarten, T., Ytterberg, A. J., Zubarev, R. A., and de Gier, J. W. (2018) Optimizing recombinant protein production in the *Escherichia coli* periplasm alleviates stress, *Appl. Environ. Microbiol.*, **84**, e00270-18, doi: 10.1128/AEM.00270-18.
 51. Jyothilekshmi, I., and Jayaprakash, N. S. (2021) Trends in monoclonal antibody production using various bioreactor syst, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 349-357, doi: 10.4014/jmb.1911.11066.
 52. Jain, N. K., Barkowski-Clark, S., Altman, R., Johnson, K., Sun, F., Zmuda, J., Liu, C. Y., Kita, A., Schulz, R., Neill, A., Ballinger, R., Patel, R., Liu, J., Mpanda, A., Huta, B., Chiou, H., Voegtli, W., and Panavas, T. (2017) A high density CHO-S transient transfection system: comparison of ExpiCHO and Expi293, *Protein Express. Purif.*, **134**, 38-46, doi: 10.1016/j.pep.2017.03.018.
 53. Wurm, F. M. (2014) 2.2 CHO History, CHO evolution and CHO genomics – an unsolvable enigma? in *Animal Cell Biotechnology: In Biologics Production*, pp. 38-59, doi: 10.1515/9783110278965.38.
 54. Dhara, V. G., Naik, H. M., Majewska, N. I., and Betenbaugh, M. J. (2018) Recombinant antibody production in CHO and NS0 cells: differences and similarities, *BioDrugs*, **32**, 571-584, doi: 10.1007/s40259-018-0319-9.
 55. Naddafi, F., Shirazi, F. H., Talebkhan, Y., Tabarzad, M., Barkhordari, F., Aliabadi Farahani, Z., Bayat, E., Moazzami, R., Mahboudi, F., and Davami, F. (2018) A comparative study of the bispecific monoclonal antibody, blinatumomab expression in CHO cells and *E. coli*, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **48**, 961-967, doi: 10.1080/10826068.2018.1525562.
 56. Jain, S., Aresu, L., Comazzi, S., Shi, J., Worrall, E., Clayton, J., Humphries, W., Hemmington, S., Davis, P., Murray, E., Limeneh, A. A., Ball, K., Ruckova, E., Muller, P., Vojtesek, B., Fahraeus, R., Argyle, D., and Hupp, T. R. (2016) The development of a recombinant scFv monoclonal antibody targeting canine CD20 for use in comparative medicine, *PLoS One*, **11**, e0148366, doi: 10.1371/journal.pone.0148366.

57. Ha, T. K., Kim, D., Kim, C. L., Grav, L. M., and Lee, G. M. (2022) Factors affecting the quality of therapeutic proteins in recombinant Chinese hamster ovary cell culture, *Biotechnol. Adv.*, **54**, 107831, doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107831.
58. Ding, M., Shen, L., Xiao, L., Liu, X., and Hu, J. (2021) A cell line development strategy to improve a bispecific antibody expression purity in CHO cells, *Biochem. Engin. J.*, **166**, 107857, doi: 10.1016/j.bej.2020.107857.
59. Sinharoy, P., Aziz, A. H., Majewska, N. I., Ahuja, S., and Handlogten, M. W. (2020) Perfusion reduces bispecific antibody aggregation via mitigating mitochondrial dysfunction-induced glutathione oxidation and ER stress in CHO cells, *Sci. Rep.*, **10**, 16620, doi: 10.1038/s41598-020-73573-4.
60. Jaluria, P., Betenbaugh, M., Konstantopoulos, K., and Shiloach, J. (2007) Enhancement of cell proliferation in various mammalian cell lines by gene insertion of a cyclin-dependent kinase homolog, *BMC Biotechnol.*, **7**, 71, doi: 10.1186/1472-6750-7-71.
61. Kol, S., Ley, D., Wulff, T., Decker, M., Arnsdorf, J., Schoffelen, S., Hansen, A. H., Jensen, T. L., Gutierrez, J. M., Chiang, A. W. T., Masson, H. O., Palsson, B. O., Voldborg, B. G., Pedersen, L. E., Kildegaard, H. F., Lee, G. M., and Lewis, N. E. (2020) Multiplex secretome engineering enhances recombinant protein production and purity, *Nat. Commun.*, **11**, 1908, doi: 10.1038/s41467-020-15866-w.
62. Avello, V., Torres, M., Vergara, M., Berrios, J., Valdez-Cruz, N. A., Acevedo, C., Molina Sampayo, M., Dickson, A. J., and Altamirano, C. (2022) Enhanced recombinant protein production in CHO cell continuous cultures under growth-inhibiting conditions is associated with an arrested cell cycle in G1/G0 phase, *PLoS One*, **17**, e0277620, doi: 10.1371/journal.pone.0277620.
63. Dietmair, S., Hodson, M. P., Quek, L. E., Timmins, N. E., Gray, P., and Nielsen, L. K. (2012) A multi-omics analysis of recombinant protein production in Hek293 cells, *PLoS One*, **7**, e43394, doi: 10.1371/journal.pone.0043394.
64. Tan, E., Chin, C. S. H., Lim, Z. F. S., and Ng, S. K. (2021) HEK293 cell line as a platform to produce recombinant proteins and viral vectors, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **9**, 796991, doi: 10.3389/fbioe.2021.796991.
65. Abaandou, L., Quan, D., and Shiloach, J. (2021) Affecting HEK293 cell growth and production performance by modifying the expression of specific genes, *Cells*, **10**, 1667, doi: 10.3390/cells10071667.
66. Cullum, S. A., Veprintsev, D. B., and Hill, S. J. (2023) Kinetic analysis of endogenous beta(2) -adrenoceptor-mediated cAMP GloSensor responses in HEK293 cells, *Br. J. Pharmacol.*, **180**, 1304-1315, doi: 10.1111/bph.16008.
67. DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., and Calos, M. P. (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system, *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 379-387, doi: 10.1128/mcb.7.1.379-387.1987.
68. Abaandou, L., Sharma, A. K., and Shiloach, J. (2021) Knockout of the caspase 8-associated protein 2 gene improves recombinant protein expression in HEK293 cells through up-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2A gene, *Biotechnol. Bioeng.*, **118**, 186-198, doi: 10.1002/bit.27561.
69. Uhler, R., Popa-Wagner, R., Kroning, M., Brehm, A., Rennert, P., Seifried, A., Peschke, M., Krieger, M., Kohla, G., Kannicht, C., Wiedemann, P., Hafner, M., and Rosenlocher, J. (2021) Glyco-engineered HEK 293-F cell lines for the production of therapeutic glycoproteins with human N-glycosylation and improved pharmacokinetics, *Glycobiology*, **31**, 859-872, doi: 10.1093/glycob/cwaa119.
70. Gunasekaran, K., Pentony, M., Shen, M., Garrett, L., Forte, C., Woodward, A., Ng, S. B., Born, T., Retter, M., Manchulenko, K., Sweet, H., Foltz, I. N., Wittekind, M., and Yan, W. (2010) Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules and monovalent IgG, *J. Biol. Chem.*, **285**, 19637-19646, doi: 10.1074/jbc.M110.117382.
71. Schaefer, W., Regula, J. T., Bahner, M., Schanzer, J., Croasdale, R., Durr, H., Gassner, C., Georges, G., Kettenberger, H., Imhof-Jung, S., Schwaiger, M., Stubenrauch, K. G., Sustmann, C., Thomas, M., Scheuer, W., and Klein, C. (2011) Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 11187-11192, doi: 10.1073/pnas.1019002108.
72. Segaliny, A. I., Jayaraman, J., Chen, X., Chong, J., Luxon, R., Fung, A., Fu, Q., Jiang, X., Rivera, R., Ma, X., Ren, C., Zimak, J., Hedde, P. N., Shang, Y., Wu, G., and Zhao, W. (2023) A high throughput bispecific antibody discovery pipeline, *Commun. Biol.*, **6**, 380, doi: 10.1038/s42003-023-04746-w.
73. Mazor, Y., Oganessian, V., Yang, C., Hansen, A., Wang, J., Liu, H., Sachsenmeier, K., Carlson, M., Gadre, D. V., Borrok, M. J., Yu, X. Q., Dall'Acqua, W., Wu, H., and Chowdhury, P. S. (2015) Improving target cell specificity using a novel monovalent bispecific IgG design, *mAbs*, **7**, 377-389, doi: 10.1080/19420862.2015.1007816.
74. Fang, X. T., Sehlin, D., Lannfelt, L., Syvanen, S., and Hultqvist, G. (2017) Efficient and inexpensive transient expression of multispecific multivalent antibodies in Expi293 cells, *Biol. Proced. Online*, **19**, 11, doi: 10.1186/s12575-017-0060-7.
75. Lu, X., Ye, Y., Wang, Y., Xu, J., Sun, J., Ji, J., Zhang, Y., and Sun, X. (2023) Rapid generation of high-quality recombinant antibodies using an Expi293F expression system for a 17 beta-estradiol immunoassay, *J. Hazard. Mater.*, **451**, 131126, doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.131126.

76. Roobol, A., Roobol, J., Smith, M. E., Carden, M. J., Hershey, J. W. B., Willis, A. E., and Smales, C. M. (2020) Engineered transient and stable over-expression of translation factors eIF3i and eIF3c in CHOK1 and HEK293 cells gives enhanced cell growth associated with increased c-Myc expression and increased recombinant protein synthesis, *Metab. Eng.*, **59**, 98-105, doi: 10.1016/j.ymben.2020.02.001.
77. Malm, M., Saghaleyni, R., Lundqvist, M., Giudici, M., Chotteau, V., Field, R., Varley, P. G., Hatton, D., Grassi, L., Svensson, T., Nielsen, J., and Rockberg, J. (2020) Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development, *Sci. Rep.*, **10**, 18996, doi: 10.1038/s41598-020-76137-8.
78. Malm, M., Kuo, C. C., Barzadd, M. M., Mebrahtu, A., Wistbacka, N., Razavi, R., Volk, A. L., Lundqvist, M., Kotol, D., Tegel, H., Hober, S., Edfors, F., Graslund, T., Chotteau, V., Field, R., Varley, P. G., Roth, R. G., Lewis, N. E., Hatton, D., and Rockberg, J. (2022) Harnessing secretory pathway differences between HEK293 and CHO to rescue production of difficult to express proteins, *Metab. Eng.*, **72**, 171-187, doi: 10.1016/j.ymben.2022.03.009.
79. Tepap, C. Z., Anissi, J., and Bounou, S. (2023) Recent strategies to achieve high production yield of recombinant protein: A review, *J. Cell. Biotechnol.*, **9**, 25-37, doi: 10.3233/jcb-220084.
80. Perez, J. G., Stark, J. C., and Jewett, M. C. (2016) Cell-free synthetic biology: engineering beyond the cell, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, a023853, doi: 10.1101/cshperspect.a023853.
81. Silverman, A. D., Karim, A. S., and Jewett, M. C. (2020) Cell-free gene expression: an expanded repertoire of applications, *Nat. Rev. Genet.*, **21**, 151-170, doi: 10.1038/s41576-019-0186-3.
82. Liu, W.-Q., Zhang, L., Chen, M., and Li, J. (2019) Cell-free protein synthesis: recent advances in bacterial extract sources and expanded applications, *Biochem. Eng. J.*, **141**, 182-189, doi: 10.1016/j.bej.2018.10.023.
83. Jin, X., and Hong, S. H. (2018) Cell-free protein synthesis for producing 'difficult-to-express' proteins, *Biochem. Eng. J.*, **138**, 156-164, doi: 10.1016/j.bej.2018.07.013.
84. Kightlinger, W., Duncker, K. E., Ramesh, A., Thames, A. H., Natarajan, A., Stark, J. C., Yang, A., Lin, L., Mrksich, M., and DeLisa, M. P. (2019) A cell-free biosynthesis platform for modular construction of protein glycosylation pathways, *Nat. Commun.*, **10**, 5404, doi: 10.1038/s41467-019-12024-9.
85. Contreras-Llano, L. E., and Tan, C. (2018) High-throughput screening of biomolecules using cell-free gene expression systems, *Synth. Biol.*, **3**, ysy012, doi: 10.1093/synbio/ysy012.
86. Dondapati, S. K., Stech, M., Zemella, A., and Kubick, S. (2020) Cell-free protein synthesis: a promising option for future drug development, *BioDrugs*, **34**, 327-348, doi: 10.1007/s40259-020-00417-y.
87. Zhang, L., Guo, W., and Lu, Y. (2020) Advances in cell-free biosensors: principle, mechanism, and applications, *Biotechnol. J.*, **15**, 2000187, doi: 10.1002/biot.202000187.
88. Ojima-Kato, T., Hashimura, D., Kojima, T., Minabe, S., and Nakano, H. (2015) In vitro generation of rabbit anti-*Listeria monocytogenes* monoclonal antibody using single cell based RT-PCR linked cell-free expression systems, *J. Immunol. Methods*, **427**, 58-65, doi: 10.1016/j.jim.2015.10.001.
89. Hashimoto, Y., Zhou, W., Hamauchi, K., Shirakura, K., Doi, T., Yagi, K., Sawasaki, T., Okada, Y., Kondoh, M., and Takeda, H. (2018) Engineered membrane protein antigens successfully induce antibodies against extracellular regions of claudin-5, *Sci. Rep.*, **8**, 8383, doi: 10.1038/s41598-018-26560-9.
90. Lee, K.-H., and Kim, D.-M. (2018) Recent advances in development of cell-free protein synthesis systems for fast and efficient production of recombinant proteins, *FEMS Microbiol. Lett.*, **365**, fny174, doi: 10.1093/femsle/fny174.
91. Stech, M., Merk, H., Schenk, J. A., Stocklein, W. F., Wustenhagen, D. A., Micheel, B., Duschl, C., Bier, F. F., and Kubick, S. (2012) Production of functional antibody fragments in a vesicle-based eukaryotic cell-free translation system, *J. Biotechnol.*, **164**, 220-231, doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.08.020.
92. Martin, R. W., Majewska, N. I., Chen, C. X., Albanetti, T. E., Jimenez, R. B. C., Schmelzer, A. E., Jewett, M. C., and Roy, V. (2017) Development of a CHO-based cell-free platform for synthesis of active monoclonal antibodies, *ACS Synth. Biol.*, **6**, 1370-1379, doi: 10.1021/acssynbio.7b00001.
93. Takeda, H., Ogasawara, T., Ozawa, T., Muraguchi, A., Jih, P. J., Morishita, R., Uchigashima, M., Watanabe, M., Fujimoto, T., Iwasaki, T., Endo, Y., and Sawasaki, T. (2015) Production of monoclonal antibodies against GPCR using cell-free synthesized GPCR antigen and biotinylated liposome-based interaction assay, *Sci. Rep.*, **5**, 11333, doi: 10.1038/srep11333.
94. Sonnabend, A., Spahn, V., Stech, M., Zemella, A., Stein, C., and Kubick, S. (2017) Production of G protein-coupled receptors in an insect-based cell-free system, *Biotechnol. Bioeng.*, **114**, 2328-2338, doi: 10.1002/bit.26346.
95. Stamatis, C., and Farid, S. S. (2021) Process economics evaluation of cell-free synthesis for the commercial manufacture of antibody drug conjugates, *Biotechnol. J.*, **16**, e2000238, doi: 10.1002/biot.202000238.
96. Stech, M., Nikolaeva, O., Thoring, L., Stocklein, W. F. M., Wustenhagen, D. A., Hust, M., Dubel, S., and Kubick, S. (2017) Cell-free synthesis of functional antibodies using a coupled in vitro transcription-translation system based on CHO cell lysates, *Sci. Rep.*, **7**, 12030, doi: 10.1038/s41598-017-12364-w.

97. Haueis, L., Stech, M., and Kubick, S. (2022) A cell-free expression pipeline for the generation and functional characterization of nanobodies, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **10**, 896763, doi: 10.3389/fbioe.2022.896763.
98. Ratner, M. (2014) Celgene wagers on Sutro's cell-free platform to ramp up ADCs, *Nat. Biotechnol.*, **32**, 1175, doi: 10.1038/nbt1214-1175.
99. Hanson, J., Groff, D., Carlos, A., Usman, H., Fong, K., Yu, A., Armstrong, S., Dwyer, A., Masikat, M. R., Yuan, D., Tran, C., Heibeck, T., Zawada, J., Chen, R., Hallam, T., and Yin, G. (2023) An integrated *in vivo/in vitro* protein production platform for site-specific antibody drug conjugates, *Bioengineering (Basel)*, **10**, 304, doi: 10.3390/bioengineering10030304.

STATE-OF-THE-ART APPROACHES FOR HETEROLOGOUS EXPRESSION OF BISPECIFIC ANTIBODIES TARGETING SOLID TUMORS

Review

A. K. Misorin, D. O. Chernyshova, and M. S. Karbyshev*

BIOCAD, 198515 Strel'na, Saint-Petersburg, Russia; e-mail: karbyshevms@biocad.ru

Bispecific antibodies (bsAbs) belong to the group of promising biotherapeutics, as their structural and functional features provide versatility. To put it simply, bsAbs bind two antigens or two epitopes on one antigen simultaneously, moreover, they are capable of directing effector immune cells to cancer cells and delivering payloads (radionuclides, toxic agents, and immunological payloads) to target cells, thus offering a broad spectrum of clinical applications. Current review is focused on bsAbs platform engineering technologies, current progress and prospects in utilization and selection of various heterologous expression systems for protein production. Furthermore we share our view on the future of the bsAbs development for solid tumor therapy.

Keywords: bispecific antibodies, antibody engineering, antibody expression systems, CHO, HEK293, *E. coli*, antibody design, solid tumors