

На правах рукописи

МОРОЗОВ АНТОН НИКОЛАЕВИЧ

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПЕРФУЗИОННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
КЛЕТОК *CHO* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К
ИММУНОГЛОБУЛИНУ E**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Вольгинский – 2018.

Работа выполнена в Обществе с ограниченной ответственностью «Международный Биотехнологический Центр «Генериум»

Научный руководитель:

- **Хамитов Равиль Авгатович**, доктор медицинских наук, профессор, МБЦ «Генериум», генеральный директор.

Официальные оппоненты:

Юрков Сергей Григорьевич, доктор биологических наук, профессор, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», начальник лаборатории

Матвеева Ирина Николаевна, доктор биологических наук, профессор, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», заведующая отделом молекулярной биологии и вирусологии

Ведущая организация:

МИРЭА – Российский технологический университет – Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова (кафедра биотехнологии и промышленной фармации)

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Распространённость атопических заболеваний, таких как астма, аллергический ринит и атопический дерматит, существенно выросла за последние несколько десятилетий, затронув все возрастные группы, как в развитых, так и в развивающихся странах. На сегодняшний день уровень заболеваемости различными формами аллергии превышает 30% [Okudaira, 1998; Pawankar et al., 2011]. Рост заболеваемости в развитых обществах тесно связан с увеличившейся нагрузкой домашними аллергенами и вредными выбросами, урбанизацией окружающей среды, нерациональным питанием, сниженным микробным и инфекционным воздействием в раннем возрасте и т.д. [Boguniewicz et al., 1998].

Атопия является серьёзной проблемой также и для ветеринарной медицины. Заболеваемость атопическим дерматитом у собак, по разным данным, достигает 10-15% [Reedy et al., 1997; Scott et al., 2001]. Аллергическая астма у кошек и крапивница у лошадей имеют большое распространение и представляют собой значительную ветеринарную проблему [Jensen-Jarolim et al., 2015].

Ключевую роль в формировании аллергических реакций у людей и животных играет иммуноглобулин Е, исходно выполняющий в организме защитную функцию от паразитарных инфекций. Гиперактивация IgE-опосредованного иммунного ответа на часто встречающиеся, безвредные антигены окружающей среды может приводить к развитию различных патологий, не только значительно снижающих качество жизни больных, но и имеющих угрозу летального исхода [Holgate, 2014].

Наиболее убедительным свидетельством того, что IgE является ключевым компонентом патогенеза аллергических заболеваний, служит успешная терапия атопической бронхиальной астмы и аллергического ринита человека препаратом на основе гуманизированного моноклонального антитела омализумаб. Механизм действия омализумаба состоит в прочном связывании иммуноглобулина Е в строго определённом сайте, благодаря чему блокируется связывание IgE с его высокоаффинным рецептором FcεRI на тучных клетках и базофилах крови и предотвращается их дегрануляция. При этом также снижается экспрессия высокоаффинных рецепторов на поверхности эффекторных клеток. Схожий эффект достигается при использовании анти-IgE антител у собак [Krahl et al., 2011], однако широкое использование терапии моноклональными антителами у животных пока ограничено.

Гуманизированное моноклональное антитело омализумаб впервые было одобрено в 2002 году по показанию бронхиальная астма средне-тяжёлого и тяжёлого течения. На данный момент омализумаб одобрен более чем в 90 странах мира, в том числе и в России. В сентябре 2015 года Минздравом РФ было принято решение о внесении омализумаба в список жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов с 2016 года.

Несмотря на высокий уровень заболеваемости бронхиальной астмой и значительную потребность в противоаллергических препаратах на основе моноклональных антител, на данный момент в России отсутствуют технологии получения отечественного биоаналога *омализумаба*. Обеспеченность препаратом омализумаба в России, по разным оценкам, составляет не более 10-15%. В рамках стратегии развития фармацевтической промышленности на период до 2020 года Правительством России поставлена задача снижения импортозависимости российского рынка лекарств и локализации производства препаратов из Перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП).

Высокие дозировки, пожизненный приём препарата и большое количество больных обуславливают высокую валовую потребность Российской Федерации в омализумабе (несколько десятков килограммов в год). Такая потребность может быть обеспечена только высокопроизводительной технологией производства, лимитирующей стадией

которого является процесс культивирования генно-модифицированных клеток млекопитающих – основного источника моноклональных антител. Учитывая современную тенденцию перехода к одноразовым биотехнологиям, обеспечивающим высокий уровень гибкости и безопасности производства, однако имеющим ограниченный рабочий объём, на первый план выходят непрерывные технологии культивирования, среди которых лидирующую позицию занимает перфузионная технология. Перфузионные технологии культивирования гораздо производительнее традиционных периодических технологий (до 5-10 раз), и приобретают всё большее распространение в США и странах Западной Европы в качестве основного средства интенсификации производства терапевтических рекомбинантных белков, в том числе моноклональных антител [Castilho, 2015; Clincke et al., 2013; Ozturk, 2006; Warikoo et al., 2012]. Кроме того, в условиях многотоннажных производств использование перфузионных технологий позволяет снизить себестоимость производства целевого продукта.

В связи с этим актуальной является разработка отечественной технологии производства омализумаба на основе непрерывного культивирования клеток-продуцентов.

Степень разработанности темы исследования

Несмотря на широкое применение, перфузионные процессы культивирования животных клеток пока мало изучены, технически сложны и в отечественной фармацевтической промышленности практически не применяются. Одним из основных вызовов при разработке перфузионного культивирования для получения биоаналогов референтных препаратов является обеспечение на протяжении *всего* процесса культивирования, длительность которого может составлять от одного месяца до полугода, необходимого профиля качества целевого белка, который должен иметь минимальные отличия от профиля референтного препарата.

Таким образом, разработка высокопроизводительной перфузионной технологии получения отечественного биоаналога *омализумаба* является актуальной пионерской задачей для отечественной фарминдустрии, и требует нетривиальных подходов к своему решению. Эти решения планируется найти на базе ООО «МБЦ «Генериум» в рамках разработки технологии получения группы биоаналогов моноклональных антител.

Цели и задачи исследования

Целью настоящего исследования являлось создание технологии непрерывного суспензионного культивирования клеток *CHO*, продуцирующих моноклональное гуманизованное антитело *GNR044*, потенциальный биоаналог *омализумаба*, и масштабирование этой технологии до опытно-промышленного уровня. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Определение целевого профиля продукта и идентификация критических показателей качества лекарственного средства омализумаб с использованием инструментов оценки рисков. Установление целевого диапазона показателей качества антитела для разработки культивирования.

2. Оптимизация состава питательной среды для повышения продуктивности культуры клеток *CHO*, экспрессирующих целевой белок.

3. Обоснование базового процесса перфузионного культивирования клон-продуцента и оценка свойств экспрессируемого белка.

4. Оптимизация физико-химических параметров культивирования для улучшения продуктивности процесса и минимизации отличий между профилями качества экспрессируемого белка и референтного препарата. Уточнение целевого диапазона показателей качества антитела.

5. Масштабирование процесса культивирования из лабораторных реакторов волнового типа в пилотные реакторы с верхнеприводной мешалкой и внешним перфузионным устройством.

6. Разработка опытно-промышленного регламента на производство фармацевтической субстанции моноклонального антитела GNR044, потенциального биоаналога омализумаба.

Научная новизна

Разработано новое решение поставленной задачи получения моноклонального антитела омализумаб путём использования непрерывного суспензионного культивирования клеток СНО с внешним перфузионным устройством взамен периодического культивирования, используемого производителем референтного препарата.

Научно обоснованы параметры управления скоростью потока питательной среды в зависимости от фазы клеточного роста, обеспечивающие наибольшую продуктивность культуры клеток, а также позволяющие получать целевое антитело с определённым содержанием кислых изоформ, соответствующим профилю референтного препарата.

Впервые в России реализован масштабный переход из лабораторного биореактора волнового типа со встроенным перфузионным устройством в пилотные вертикальные биореакторы с верхнеприводной мешалкой и внешним перфузионным устройством. По результатам данного перехода показана хорошая масштабируемость процесса культивирования от 3 л до 100 л.

На основании разработанного способа культивирования получен патент на изобретение RU2672318 «Способ получения моноклональных антител терапевтического назначения с помощью непрерывного культивирования клеток СНО».

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в ходе работ результаты использованы в организации производства отечественного лекарственного препарата на основе моноклонального антитела GNR044, потенциального биоаналога омализумаба, на производственной площадке АО «ГЕНЕРИУМ».

Разработанные методические подходы могут быть применены при разработке непрерывных биотехнологических процессов производства других рекомбинантных белков как медицинского, так и ветеринарного назначения.

Данные, полученные в ходе исследований, включены в опытно-промышленный регламент ОПР №89761464-47-16 производства фармацевтической субстанции моноклонального антитела GNR044, потенциального биоаналога омализумаба. Лекарственный препарат на основе моноклонального антитела GNR044, созданный с использованием разработанной технологии, успешно прошёл доклинические испытания и первую фазу клинических испытаний.

Личный вклад соискателя

Автор выполнял работы по выбору состава питательной среды и оптимизации режима потока среды в начальной стадии процесса культивирования, обосновал скорость отбора клеточной суспензии для стабилизации ростовых характеристик клеток продуцента и продления эффективного продукционного периода, оптимизировал параметры процесса культивирования для достижения целевого профиля изоформ с различным зарядом. Также автор проводил установочный лабораторный процесс культивирования.

Оценка критичности показателей качества целевого белка, а также обоснование и уточнение целевого профиля препарата для разработки культивирования осуществлена автором совместно с сотрудниками Отдела аналитических методов МБЦ «Генериум». Совместно с к.х.н. Фабричным И. П. проведена разработка процессов очистки целевого белка, получения фармацевтической субстанции и лекарственного препарата. Масштабирование технологии до пилотного уровня и сравнение двух перфузионных

систем – лабораторной и полупромышленной – проводилось совместно с сотрудниками управления экспериментального производства под руководством к.б.н. Стратоновой Н.В.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Основные результаты исследований докладывались на следующих конференциях:

- ✓ Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития-2013» (Москва);
- ✓ Научная конференция, посвящённая пятилетию ООО «МБЦ «Генериум», 2016 г.
- ✓ Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития-2017» (Москва).

Публикации

По результатам диссертации опубликовано 5 статей в научных журналах, в том числе 3 в журналах, рекомендованных ВАК, получен патент на изобретение. Также опубликованы одни тезисы международного конгресса.

Структура и объём диссертации

Работа состоит из введения, обзора литературы, описания собственных исследований, материалов и методов исследований, результатов исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, описания практического использования результатов, рекомендаций по использованию научных выводов, списка литературы и приложений. Диссертация изложена на 162 страницах, включая 43 рисунка и 24 таблицы. Список цитируемой литературы содержит 144 источника.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ И РЕЗУЛЬТАТЫ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Разработанная технология непрерывного культивирования клеток СНО обеспечивает получение антитела GNR044, потенциального биоаналога омализумаба, с заданным целевым профилем физико-химических показателей и биологической активности, с продуктивностью 410 ± 30 мг очищенного белка с 1 л культуральной жидкости.

2. Оптимизированный режим ускорения протока питательной среды в начальной стадии процесса культивирования способствует эффективному выводу клеточной культуры в фазу стационарного роста и улучшает экономику процесса культивирования.

3. Оптимизированный режим отбора суспензии из биореактора (блидинга клеток) приводит к увеличению длительности продукционной фазы и стабилизации физико-химических характеристик экспрессируемого белка на протяжении минимум 30 суток.

4. Основные характеристики разработанной технологии непрерывного культивирования клеток СНО (кривая роста клеток, продуктивность, удельная скорость потребления глюкозы, длительность продукционной фазы) остаются стабильными при масштабировании процесса из волнового биореактора с рабочим объёмом суспензии клеток 3 литра в вертикальный биореактор с мешалкой и внешним перфузионным устройством с рабочим объёмом суспензии клеток 100 литров.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработка технологии была выполнена в 2013-2017 гг. на базе Международного Биотехнологического Центра «Генериум» в отделе разработки процессов. Разработанная технология была масштабирована в пилотном биореакторе SUB100 в отделе масштабирования и внедрения технологий АО «ГЕНЕРИУМ». Анализ фармацевтических субстанций и лекарственного препарата проводили в отделе аналитических методов МБЦ «Генериум».

Клеточная культура. В работе была использована клеточная линия СНО 11A8, полученная в МБЦ «Генериум» на основе линии СНО-K1 путём трансфекции клеток плазмидной ДНК, несущей ген целевого белка.

Для лабораторных исследований использовали исследовательский банк клеток (ИБК), для масштабирования процесса в пилотном биореакторе – охарактеризованный главный банк клеток (ГБК).

Хранение криокультур осуществлялось при температуре жидкого азота (минус 196 °С).

Расконсервация культуры клеток проводилась с использованием водяной бани при температуре 37 °С в течение 2-3 минут. В ламинарном шкафу оттаявшее содержимое криопробирки переносили в стерильную пробирку объёмом 50 мл и добавляли 20 мл базовой питательной среды. Для удаления остаточного количества среды криоконсервации пробирку центрифугировали при 100 g в течение 5 минут. Супернатант декантировали, осевшие клетки ресуспендировали в 25 мл свежей питательной среды и переносили в колбу Эрленмейера объёмом 125 мл.

Подготовка инокулята и эксперименты в колбах Эрленмейера. Для получения инокулята клетки выращивали в шейкере-инкубаторе Climo-Shaker ISF1-XC (Kuhner, Швейцария) в колбах Эрленмейера объёмом 125, 250 или 500 мл на коммерческой питательной среде BalanCD CHO Growth A (Irvine Scientific, США), содержащей 6 mM L-глутамин (Applichem, Германия) при 37 °С, 5 % CO₂, 90-110 об/мин. Полученный инокулят вносили в биореактор, содержащий питательную среду того же состава, предварительно нагретую и уравновешенную с газовой смесью воздуха и углекислого газа (95:5).

Аналогичные условия культивирования в колбах Эрленмейера использовали в ходе первичных экспериментов по подбору добавки к питательной среде.

Фед-батч культивирование осуществляли в биореакторах Biostat B 2L (Sartorius, Германия). Начальный рабочий объём суспензии клеток составлял 1 литр. Посевная концентрация клеток – $0,3 \pm 0,03$ млн./мл. Базовая питательная среда - BalanCD CHO Growth A.

В режиме фед-батч подпитку осуществляли с помощью коммерческой добавки BalanCD CHO Feed 3 (Irvine Scientific), вносимой болюсно в количестве 5% от начального объёма суспензии 4 раза за процесс.

Концентрацию растворённого кислорода в биореакторах поддерживали на уровне 40 % от насыщения с помощью автоматического регулирования оборотов мешалки в диапазоне 200-400 об/мин и подачи кислорода со скоростью 10 мл/мин через кольцевой макробарботёр, расположенный непосредственно под мешалкой. Дополнительно над слоем жидкости (в оверлей) со скоростью 100 мл/мин подавалась смесь воздуха с углекислым газом в соотношении 95:5 для поддержания концентрации растворённого CO_2 в культуральной жидкости в течение процесса культивирования в приемлемом диапазоне.

Контроль pH осуществляли с помощью регулируемой подачи CO_2 или 5 %-ного раствора гидроксида натрия.

Хеостат. Культивирование клеток в режиме хеостат осуществляли в биореакторах Biostat B 2L (Sartorius, Германия). Рабочий объём суспензии составлял 1,0. Посевная концентрация клеток – $0,5 \pm 0,1$ млн./мл. Состав питательной среды: 90 % BalanCD CHO Growth A, 10% BalanCD CHO Feed 3 (Irvine Scientific), 6 мМ L-глутамин.

Концентрацию растворённого кислорода в биореакторах поддерживали на уровне 40 % от насыщения с использованием газовой стратегии, аналогичной применяемой при фед-батч культивировании. pH-статирование осуществляли в течение всего процесса с помощью подачи CO_2 или 5 %-ного раствора гидроксида натрия.

С помощью предварительно калиброванных перистальтических насосов, расположенных на блоке управления биореактором, осуществляли непрерывную подачу свежей питательной среды и отбор суспензии клеток.

Перфузионное культивирование клеток в лабораторном масштабе осуществляли в одноразовых биореакторах волнового типа Sartorius Flexsafe 2L и 10L perfusion (Sartorius, Германия) со встроенной перфузионной мембраной. Рабочий объём суспензии составлял 1,0 и 3,0 л соответственно. Посевная концентрация клеток – $0,5 \pm 0,1$ млн./мл. Состав питательной среды для перфузии: 90 % BalanCD CHO Growth A, 10% BalanCD CHO Feed 3 (Irvine Scientific), 6мМ L-глутамин.

Концентрацию растворённого кислорода в биореакторах поддерживали на уровне 40-50 % от насыщения. Расход газовой смеси составлял 0,2-0,5 л/мин. pH-статирование осуществляли в течение всего процесса культивирования с помощью подачи CO_2 или 5 %-ного раствора гидроксида натрия. Частота качания платформы с биореактором находилась в диапазоне 22-28 кач/мин. Угол наклона платформы составлял 6° . Температура культивирования в фазе роста – 37°C . При достижении скорости перфузии $0,5 \text{ сут}^{-1}$ осуществляли снижение температуры до $32-34^\circ\text{C}$.

С помощью перистальтических насосов, расположенных на блоке управления биореактором, осуществляли непрерывную подачу свежей питательной среды и отбор бесклеточного перфузата и суспензии клеток. Контроль перфузии велся с помощью двух весовых платформ Midrics (Sartorius)

Проток питательной среды и отбор перфузата включали через 48 часов после инокуляции биореактора. Скорость перфузии увеличивали линейно от 0 до $1,0 \text{ сут}^{-1}$ с различным ускорением – $0,1 \text{ сут}^{-2}$, $0,15 \text{ сут}^{-2}$ и $0,25 \text{ сут}^{-2}$. В каждом процессе культивирования за сутки до достижения максимальной скорости перфузии начинали отбор клеточной суспензии (блидинг).

Культивирование в пилотном масштабе осуществляли в биореакторе SUB100 (HyClone, США). Газовая стратегия в биореакторе SUB100 реализовывалась с использованием микробарботёра (размер пор – 20-40 мкм) и трубки с открытым выходом

(диаметр отверстия – 4-5 мм). Микробарботёр обеспечивал насыщение культуральной жидкости кислородом, трубка с открытым выходом, в свою очередь, необходима для выдувания избыточного углекислого газа. Обороты мешалки устанавливались на уровне 100-110 об/мин. Рабочий объём суспензии составлял 50 л. В качестве перфузионного устройства использовалась система ATF 6 (Repligen, США), основным элементом которой служил половолоконный фильтр с размером пор 0,2 мкм.

Глубинная фильтрация. Осветление культуральной жидкости, содержащей клетки и клеточный дебрис, проводили с использованием глубинных фильтров ZetaPlus (3М, США) с двухслойным материалом 60SP02A. Скорость фильтрации устанавливали в диапазоне 0,1-0,5 мл/см²/мин. Подачу культуральной жидкости осуществляли с помощью перистальтического насоса L/S Standard Digital Pump (MasterFlex, США). Фильтрацию останавливали при достижении избыточного давления 2 бара.

Очистка целевого белка, получение фармацевтической субстанции

Аффинная хроматография

Перед нанесением осветленной культуральной жидкости на колонку с MabSelect SuRe, сорбент последовательно промывали 5 CV (CV – объём колонки) раствора 0,1 М NaOH, 5 CV воды очищенной и уравнивали колонку 5 CV буфера А (15 мМ натрия фосфат, 150 мМ натрия хлорид, рН 7,2-7,5).

На хроматографическую колонку наносили культуральную жидкость, со скоростью 180 см/ч. По окончании нанесения сорбент последовательно промывали 8 CV буфера А, 10 CV буфера В (15 мМ натрия фосфат, 1 М натрия хлорид, рН 7,2-7,5), 10 CV буфера С (15 мМ натрия фосфат, 5 % изопропанол, рН 7,2-7,5), 5 CV буфера D (6,0 мМ гистидин, 100 мМ сахараза, рН 5,5) со скоростью 200 см/ч. Фракцию, содержащую целевой белок, элюировали с сорбента обратным потоком буфера Е (6,0 мМ гистидин, 100 мМ сахараза, рН 3,2). Сбор фракции начинали при достижении величины оптической плотности выше 30-50 mAU при длине волны 280 нм и заканчивали (после прохождения максимума на кривой элюции) при снижении оптической плотности элюата до 30-50 mAU.

Мультимодальная фильтрация на Capto adhere

Перед фильтрацией сорбент последовательно промывали 5 CV воды очищенной, 5 CV раствора 0,5 М NaOH, 5 CV воды очищенной и уравнивали 10 CV буфера F (6,0 мМ гистидин, 100 мМ сахараза, рН 5,8).

На хроматографическую колонку с Capto adhere наносили элюат MabSelect SuRe, дотитрованный до рН 5,8 раствором 0,5 М гидроксида натрия, со скоростью 250 см/ч. Фильтрат собирали с момента начала активного роста оптической плотности (обычно с ~25 mAU). По окончании нанесения образца фильтрацию продолжали буфером F до падения оптической плотности до значения ~25-30 mAU.

Концентрирование и получение фармацевтической субстанции

Кассету Pellicon 2Mini, 50 кДа (0,1 м², Millipore) последовательно промывали 0,2 л 0,5 М гидроксида натрия, 0,2 л воды очищенной, уравнивали 0,5 л буфера G (6,2 мМ гистидин, 106 мМ сахараза, рН 6,0).

рН фильтрата с предыдущей стадии доводили до 6,0±0,05 раствором 0,5 М гидроксида натрия.

Подготовленный фильтрат концентрировали до ~52-57 мг/мл, исходя из расчетного объема полученного пермеата. Ретентат собирали. Систему промывали буфером G в количестве 1-3 CV системы (15-50 мл) и объединяли с ретентатом для получения фармсубстанции с концентрацией 48-52 мг/мл. Добавляли необходимое количество раствора 20% полисорбата 20 до концентрации 0,0125%.

Лиофилизация антитела GNR044 в лабораторных условиях проводилась в лиофильной сушилке с каскадной системой охлаждения коллектора FreeZone (Labconco, США). Перед лиофилизацией фармацевтическую субстанцию целевого белка фильтровали через стерилизующий фильтр с размерами пор 0,2 мкм. В асептических условиях стерильную субстанцию заливали по 4 мл в стерильные апиrogenные флаконы 6R (общий объём флакона – 10 мл), которые затем частично укупоривались резиновой пробкой и помещались в сушилку. Затем происходило замораживание субстанции при температуре полки минус 40 °С в течение 4-5 часов. Первичная сушка проводилась при температуре полки минус 26 °С и остаточном давлении 0,1 торр, вторичная – при температуре плюс 25 °С. После окончания сушки флаконы полностью укупоривались резиновыми пробками.

Аналитика. Определение концентрации и жизнеспособности клеток, а также их среднего диаметра проводили с помощью автоматического счётчика клеток Countess (Invitrogen, США). Концентрацию глюкозы и лактата в культуральной жидкости измеряли на анализаторе BioSen C-line (EKF-Diagnostic, Германия). Контрольное измерение pH культуральной жидкости проводили непосредственно после отбора пробы на pH-метре SevenEasy S20 (Mettler Toledo, Швейцария).

Определение концентрации антител в культуральной жидкости проводили путем выделения целевого белка на аффинном сорбенте MabSelect (GE Healthcare, Швеция) и измерения его количества на спектрофотометре BioPhotometer Plus (Eppendorf, Германия) при длине волны 280 нм с использованием расчетного коэффициента экстинкции. Элюат белка затем использовали для аналитических целей.

Анализ профиля гликозилирования целевого белка проводили с использованием системы ВЭЖХ Alliance e2695 (Waters, США) с детектором Multi λ Fluorescence Detector 2475 (Waters) на колонке TSKgel Amide-80 (Tosoh Corporation, Япония).

Анализ зарядовых изоформ выделенного целевого белка проводили методом катионообменной ВЭЖХ на колонке ProPac WCX-10 BioLC Analytical, 4x250 мм (Thermo Scientific, США), при длине волны 280 нм как с обработкой, так и без обработки 1 % (м/м) карбоксипептидазой В (Sigma, Германия).

Анализ степени изомеризации остатков аспарагиновой кислоты и количества неспаренных цистеинов проводили методом гидрофобной ВЭЖХ с предварительной обработкой папаином на колонке TSKgel Phenyl-5PW, размером 7,5 × 75 мм, с диаметром частиц 10 мкм (Tosoh Bioscience).

Анализ чистоты белка (содержания агрегированных форм, мономера и фрагментов молекул белка) проводили методом гель-фильтрационной ВЭЖХ на колонке BioSep SEC-s2000, размером 4,6x300 мм (Phenomenex) с предколонкой Security Guard Cartridge, GFC 2000, размером 4x3,0мм (Phenomenex).

Определение подлинности белка проводили методом изоэлектрического фокусирования в полиакриламидном геле (ПААГ) с окрашиванием раствором Кумасси G-250

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Оценка критичности показателей качества разрабатываемого препарата

Биофармацевтические препараты, в особенности моноклональные антитела, имеют целый ряд показателей качества, которые потенциально могут влиять на безопасность и/или эффективность лекарственного средства. Определение критических показателей качества является одним из наиболее сложных шагов в ходе применения подхода Quality by Design при разработке биологических лекарственных средств. При этом целевой профиль данных показателей в дальнейшем служит базисом для разработки технологии производства фармацевтической субстанции и лекарственного препарата. В случае

разработки биоаналога целевой профиль качества жёстко привязан к характеристикам референтного препарата.

Определение критических показателей качества было проведено с помощью *ранжирования рисков*. Для всех показателей была проведена оценка их воздействия на безопасность (токсичность и иммуногенность) и эффективность (биологическая активность, фармакодинамика и фармакокинетика) препарата.

Необходимо отметить, что критические показатели качества биоаналога омализумаба в наибольшей степени определяются его основной функцией – связыванием свободного IgE и соответствующим нейтрализующим эффектом. Эффекторные Fc-ассоциированные функции (CDC и ADCC) рассматриваются в качестве менее критических.

Была проведена оценка критичности тех показателей качества, которые, согласно нашему опыту и литературным данным, зависят от процесса культивирования продуцента. Итоги оценки критичности параметров качества омализумаба представлены в табл. 1.

Таблица 1. Уровень критичности показателей качества омализумаба, зависящих от процесса культивирования

Показатель качества	Эффективность		ФК/ФД		Иммуногенность		Безопасность		Общий уровень риска
	В	Н	В	Н	В	Н	В	Н	
Изомеризация	20	3	4	5	4	7	4	5	60
Изоформы с различным зарядом	20	3	4	3	4	5	4	5	60
Неспаренные цистеины	20	3	4	5	4	5	4	5	60
С-концевые лизины	2	3	4	5	2	5	2	5	20
Fc-гликозилирование	4	3	4	3	4	3	4	3	12
Гликирование	2	3	2	5	2	5	2	5	10

ФК/ФД – фармакокинетика, фармакодинамика, В – уровень воздействия параметра качества на эффективность / безопасность / ФК/ФД / иммуногенность ЛС; Н – уровень неопределённости относительно воздействия параметра качества на эффективность / безопасность / ФК/ФД / иммуногенность ЛС. Предел критичности – 28.

На основании проведённой оценки критичности параметров качества омализумаба, а также результатов анализа 4 серий референтного препарата и нормативов, установленных производителем в спецификации на «Ксолар», были определены допустимые диапазоны для каждого из параметров. Для наиболее критичных параметров (изомеризация, кислые изоформы и неспаренные цистеины) допустимый диапазон был установлен аналогичным диапазоном варьирования внутри серий референтного препарата. Для менее критичных показателей диапазон был расширен в соответствии со степенью критичности.

Определение критических параметров процесса получения культуральной жидкости с целевым белком

Установление связи между критическими параметрами процесса культивирования и критическими показателями качества продукта – одна из наиболее важных задач, выполняемых на протяжении всей разработки биологических лекарственных средств в рамках концепции QbD. Использование опыта, полученного при реализации предыдущих разработок, может существенно сократить время выполнения проекта.

С использованием имеющегося опыта разработки непрерывных и периодических процессов культивирования нами была проведена оценка рисков различных этапов технологии получения культуральной жидкости с целевым белком. Эта оценка показала, что при использовании стандартных подходов к этапам получения инокулята и осветления культуральной жидкости культивирование продуцента в продукционном биореакторе является единственным этапом, имеющим значительный риск для качества продукта.

Были проанализированы различные параметры процесса культивирования в продукционном биореакторе и проведена оценка их критичности с точки зрения влияния на критические показатели качества целевого белка (табл. 2).

Таблица 2. Сводная информация о влиянии параметров процесса на качество целевого белка

Параметр	Воздействие параметра на качество белка/уровень риска
Начальная плотность клеток	Не влияет на качество целевого белка и рассматривается как параметр с малой степенью риска
Температура	Может оказывать умеренное влияние на гликозилирование белка (степень галактозилирования) и рассматривается как параметр со средней степенью риска
pH	Оказывает влияние на изоформы с различным зарядом и рассматривается как параметр с <i>высокой</i> степенью риска
Уровень растворённого кислорода	Может влиять на качество продукта при недостаточном уровне контроля за процессом культивирования, рассматривается как параметр со средней степенью риска.
Уровень растворённого CO ₂	При определённых условиях может влиять на качество продукта, рассматривается как параметр со средней степенью риска.
Продолжительность процесса	В течение процесса культивирования качество целевого белка может меняться в зависимости от фазы роста клеток, их физиологического состояния, а также эффективности сепарирующего устройства. Продолжительность процесса рассматривается как параметр с <i>высокой</i> степенью риска.
Скорость протока среды (скорость перфузии)	Изменяя время пребывания целевого белка в биореакторе, может влиять на степень ферментативной и неферментативной деградации продукта, в связи с этим рассматривается как параметр с <i>высокой</i> степенью риска.
Скорость блидинга	Может значительно влиять на качество продукта, рассматривается как параметр с <i>высокой</i> степенью риска.
Ускорение перфузии	Влияние на качество белка не изучено, поэтому рассматривается как параметр с <i>высокой</i> степенью риска.

Выбор состава питательной среды

Состав питательной среды является фактором, во многом определяющим эффективность перфузионного культивирования. Оптимально выбранные базовая питательная среда и добавки к ней позволяют добиваться как высокой продуктивности процесса, так и влиять на качество экспрессируемого белка, что особенно актуально при разработке биоаналогичных лекарственных средств.

В ходе оптимизации состава питательной среды проводились эксперименты в колбах Эрленмейера, а также в биореакторах Biostat В Twin. В первом случае культивирование осуществлялось в режиме фэд-батч, во втором случае применялся режим хемостата. Несмотря на то, что целевым является непрерывный перфузионный процесс, подбор оптимальной добавки к питательной среде в периодическом режиме культивирования является надёжным и быстрым методом определения наиболее

эффективного сочетания среды и добавки. Этот тезис был подтверждён нами ранее при разработке процессов производства нескольких других рекомбинантных белков.

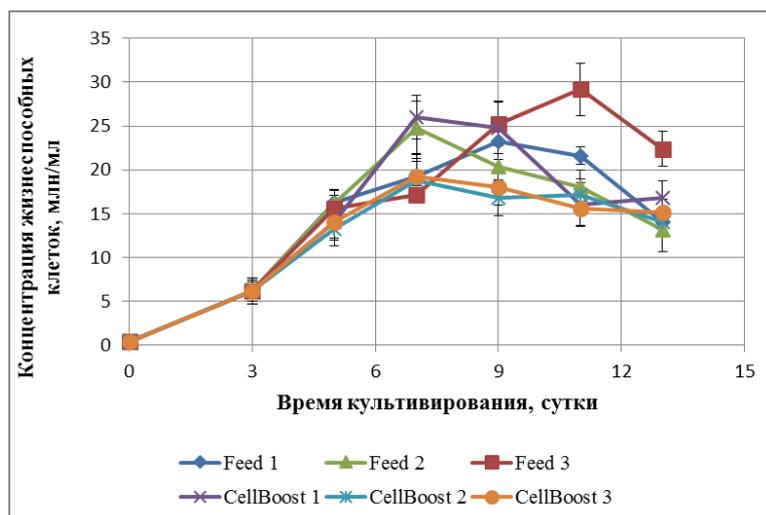


Рисунок 1. Кривые роста клеток линии CHO 11A8 в ходе скрининга добавок к питательной среде. Культивирование проводилось в режиме фед-батч (количество независимых экспериментов $n = 3$, предел погрешностей обозначает размах).

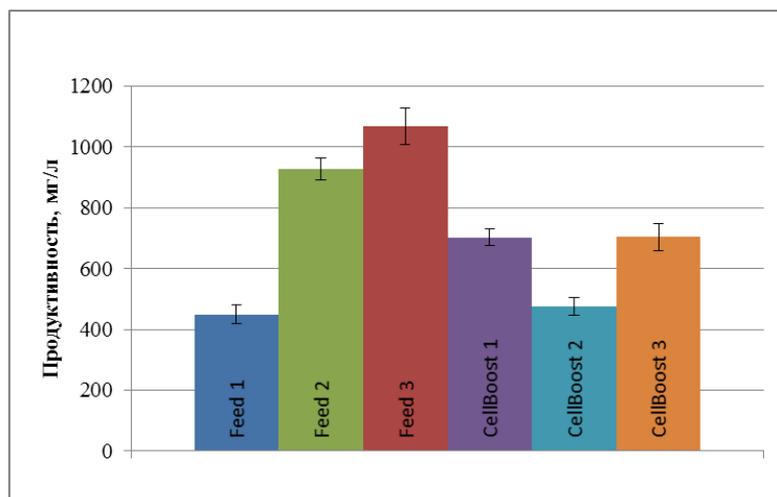


Рисунок 2. Продуктивность клеток линии CHO 11A8 при культивировании в режиме фед-батч на среде BalanCD CHO Growth A с использованием различных добавок ($n = 3$, предел погрешностей обозначает размах).

На рис. 1 приведены кривые роста продуцента CHO 11A8 при культивировании на базовой среде BalanCD CHO Growth A с использованием различных добавок производства Irvine Scientific и HyClone. На рис. 2 приведены данные по продуктивности культуры. Установлено, что оптимальным сочетанием среда/добавка является смесь BalanCD CHO Growth A с Feed 3. Для определения оптимальной концентрации добавки в питательной среде проводились эксперименты в режиме хемостата. Для этого использовались биореакторы Biostat B (Sartorius) с рабочим объёмом суспензии 1 л и скоростью разбавления, равной $0,2 \text{ сут}^{-1}$. Было показано, что оптимальной концентрацией добавки Feed 3 в среде BalanCD CHO Growth A является 10% (табл. 3)

Таблица 3. Зависимость пиковой концентрации клеток продуцента и выхода целевого белка от концентрации добавки Feed 3 в базовой питательной среде (n = 2).

Концентрация добавки, %	Пиковая концентрация клеток, млн./мл	Титр белка, мг/л
5	10,1±1,1	246±20
7,5	12,2±1,3	312±30
10	17,1±1,7	496±51
12,5	16,5±1,8	470±49
15	15,0±1,4	435±46

Оптимизация режима ускорения протока питательной среды

В перфузионных процессах в стадии накопления биомассы клеток используют постепенное увеличение скорости протока среды от нуля до некоторого максимального значения, определяемого техническими возможностями производственного оборудования и экономической целесообразностью. Скорость изменения подачи питательной среды на начальном этапе перфузионного процесса может существенно влиять на основные параметры роста и продуктивности культуры клеток СНО и критические свойства экспрессируемого белка.

Было показано, что недостаточно быстрое увеличение скорости перфузии ($0,1 \text{ сут}^{-2}$) приводит к метаболическим перестроениям клеток линии 11A8, снижающим пролиферативные характеристики культуры, и, одновременно, увеличивающим размер клеток и их удельную продуктивность. Качество экспрессируемого белка при этом значительно изменяется, что может привести к снижению эффективности и безопасности лекарственного препарата. Стоит отметить, что жизнеспособность культуры остаётся стабильно высокой в течение всего процесса культивирования. Проведённое нами исследование профиля гликанов белка, экспрессируемого гипертрофированными клетками, показало уменьшение степени фукозилирования гликопротеина за счёт увеличения доли гликанов G0 и Man5 (рис. 3).

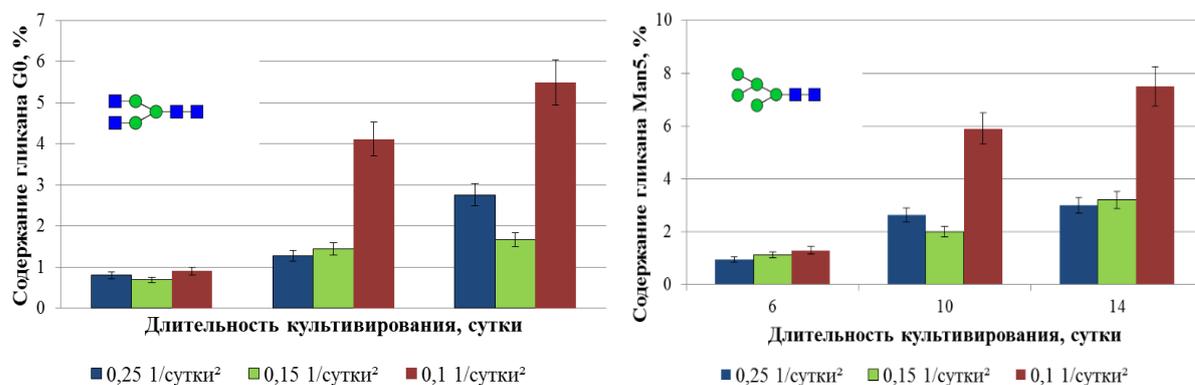


Рисунок 3. Относительное содержание N-связанных гликанов G0 и Man5 в Fc-домене экспрессируемого белка при разном ускорении перфузии (n = 2, предел погрешностей обозначает размах)

Слишком стремительное увеличение скорости перфузии ($0,25 \text{ сут}^{-2}$) поддерживает высокую удельную скорость роста продуцента в течение всего этапа накопления биомассы, и при достижении максимальной скорости протока клетки не успевают перестроиться, их концентрация превышает предельную для данной питательной среды, вследствие чего рост клеток оказывается лимитированным по одному или нескольким компонентам. Это, в свою очередь, приводит к резкому падению жизнеспособности клеток, разбалансировке процесса и длительному периоду восстановления культуры.

Восстановление культуры может занимать несколько суток, что негативно отражается на технико-экономических характеристиках процесса (рис. 4).

При ускорении перфузии $0,15 \text{ сут}^{-2}$ не наблюдалось отклонений от нормального течения культивирования. На 12-13-е сутки клетки выходили на стационарную фазу, в течение которой скорость роста, жизнеспособность и продуктивность клеток, а также качество белка не претерпевали серьёзных изменений.

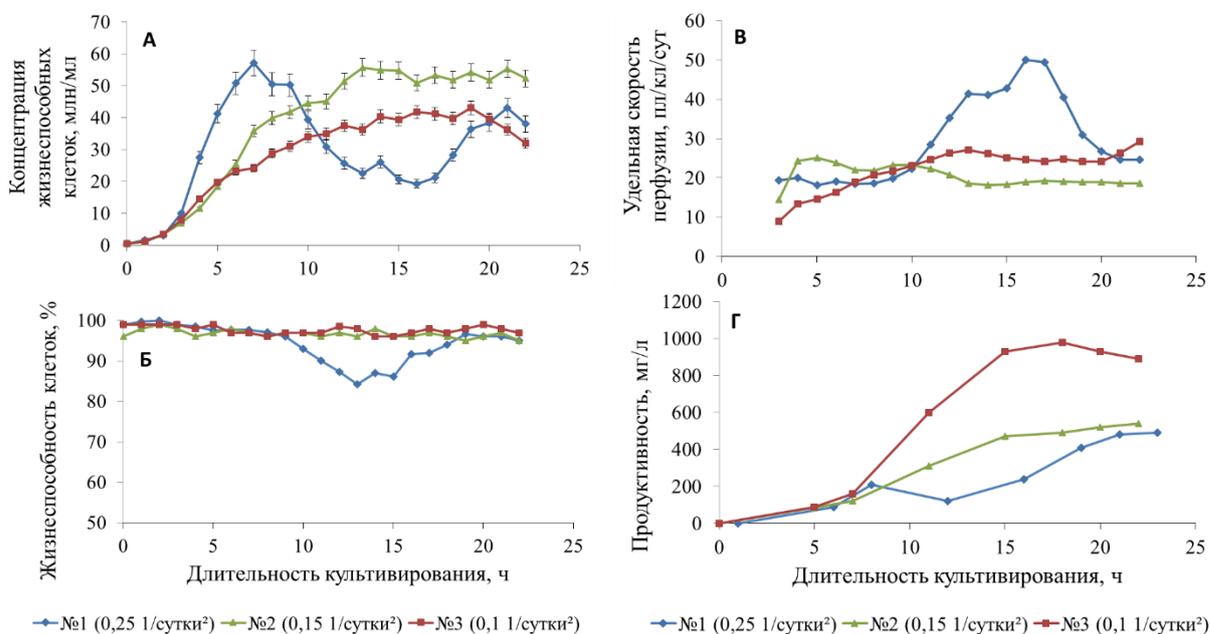


Рисунок 4. Кривые роста (А) и жизнеспособности (Б) клеток, изменения удельной скорости перфузии (В) и продуктивности культуры (Г) при различных ускорениях перфузии ($n = 2$, предел погрешностей обозначает размах)

Большинство исследователей сходится во мнении, что ключевым фактором в ходе непрерывного перфузионного культивирования является удельная скорость перфузии (УСП), представляющая собой отношение скорости перфузии к концентрации клеток в биореакторе. Однако подход к оптимизации начального этапа перфузионного культивирования, основанный на поддержании определённой удельной скорости перфузии, не может быть реализован в той мере, в которой он используется для стационарной фазы процесса. Использование такого параметра, как ускорение перфузии, является более перспективным для разработки эффективных процессов культивирования.

Выбор скорости блидинга

Основным условием любого непрерывного процесса является его стабилизация на определённом уровне ключевых параметров и длительное функционирование без значительных колебаний качественных характеристик продукта. В случае перфузионного культивирования критичным является поддержание постоянного качества экспрессируемого клетками белка для обеспечения заданных показателей эффективности и безопасности лекарственного средства.

Нами были проведены эксперименты по оценке влияния непрерывного отбора клеточной суспензии из биореактора (блидинга) на стабилизацию роста клеток и экспрессию целевого белка. В качестве контроля выступал процесс без блидинга. Показано, что при отсутствии отбора клеток достигается максимальная клеточная плотность, однако, затем жизнеспособность клеток резко снижается, что ведёт как к снижению тотальной продуктивности процесса культивирования, так и к критическим изменениям в свойствах белка (колебания содержания N-гликанов, изоформ по зарядам, а также примесей, связанных с процессом производства). В процессе с блидингом на уровне

0,05 сут⁻¹ отмечается более высокая пиковая и средняя продуктивности, чем в вариантах с блидингом 0,1 и 0,2 сут⁻¹, однако, как ростовые характеристики, так и качество целевого белка нестабильны.

В процессе с блидингом на уровне 0,1-0,2 сут⁻¹ наблюдается стабилизация концентрации клеток и выхода целевого белка (рис. 5). В случае блидинга 0,2 сут⁻¹ отмечается более низкая равновесная концентрация клеток и продуктивность процесса, что обуславливает выбор в пользу блидинга 0,1 сут⁻¹.

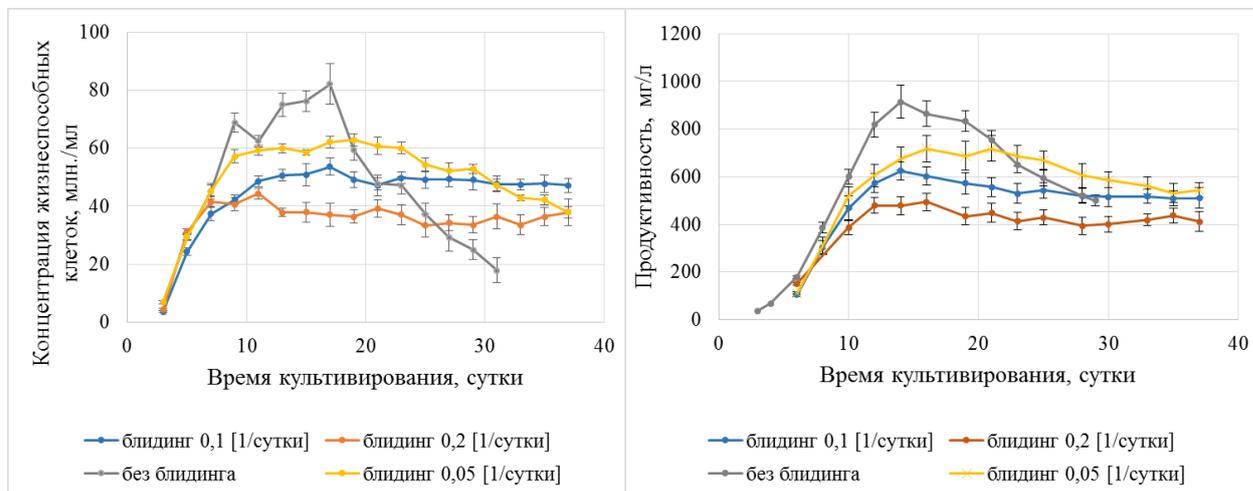


Рисунок 5. Кривые роста и продуктивности клеток линии СНО 11А8 в перфузионных процессах с различной степенью блидинга (n = 2, предел погрешностей обозначает размах)

Оптимизация профиля изоформ целевого белка с различными зарядами

Обеспечение постоянно высокого качества моноклональных антител осложняется их крайней гетерогенностью. Это справедливо для всех антител благодаря разнице в гликозилировании, нестабильности в ходе производства и терминального процессинга.

Известно, что культивирование клеток продуцента оказывает наибольшее влияние на природу и уровень модификаций, определяющих гетерогенность моноклональных антител. Основной вклад в гетерогенность зарядовых форм рекомбинантных белков вносят неферментативные реакции, сильно зависящие от окружающих условий, таких как рН, температура и длительность экспозиции.

При разработке биоаналога омализумаба мы столкнулись с тем, что содержание кислых изоформ в референтном препарате находится на достаточно низком уровне (10-11%), не характерном для антительных препаратов, получаемых с помощью культивирования в режиме фэд-батч, таких как, например, трастузумаб, инфликсимаб, бевацизумаб и др. Разработка процесса культивирования, имеющего высокий выход по целевому белку и одновременно эффективного в плане воспроизведения профиля изоформ референтного препарата, осложнялось тем, что условия, способствующие более высокой продуктивности, одновременно негативно сказываются на содержании кислых изоформ.

Проведённые исследования показали существенное влияние режима культивирования и отдельных технологических параметров на содержание кислых изоформ в составе антитела GNR044. Снижение уровня рН и сокращение времени культивирования в режиме фэд-батч приводит к заметной убыли кислой фракции целевого белка. Однако при сокращении длительности процесса страдают его экономические характеристики.

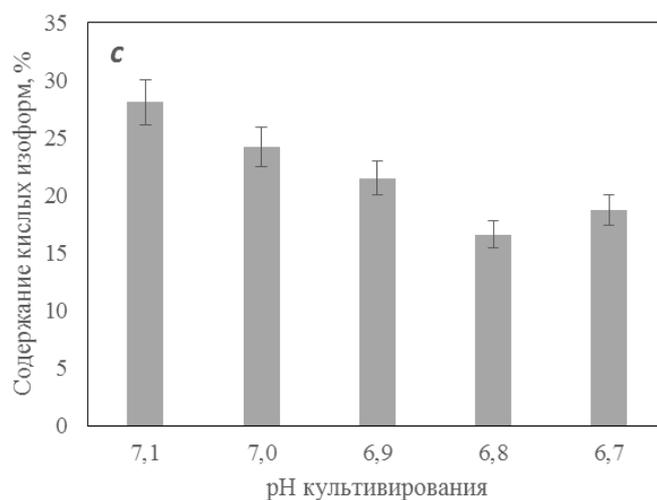


Рисунок 6. Влияние уровня pH питательной среды на содержание кислых изоформ антитела GNR044 на 14-ые сутки культивирования в режиме фед-батч (n = 3, предел погрешностей обозначает размах)

Таблица 4. Зависимость содержания кислых изоформ целевого белка от времени культивирования и pH среды в режиме фед-батч (n = 3, приведены средние значения)

Продолжительность культивирования, сут	Содержание кислых изоформ в целевом белке, % при pH питательной среды				
	7,1±0,03	7,0±0,03	6,9±0,03	6,8±0,03	6,7±0,03
8	19,7	17,1	15,3	12,1	13,2
10	22,1	19,6	17,3	13,0	14,9
12	25,2	21,8	19,5	14,2	16,7
14	28,1	24,2	21,5	16,6	18,7

Для проверки эффективности непрерывного культивирования в отношении целевого антитела было проведено несколько серий экспериментов в перфузионных биореакторах со встроенной мембраной Flexsafe 2L perfusion (Sartorius Stedim).

В ходе первого эксперимента, проводимого при скорости перфузии $1,0 \text{ сут}^{-1}$, было установлено, что количество кислой фракции меняется в течение культивирования незначительно, не увеличиваясь даже в фазе отмирания клеток, и составляет $9,3 \pm 0,5\%$.

Во второй серии экспериментов исследовали влияние скорости протока питательной среды на содержание кислых изоформ целевой молекулы. Верхний предел скорости протока варьировали от $0,25 \text{ сут}^{-1}$ до $2,0 \text{ сут}^{-1}$. Интересно, что даже при самой низкой скорости протока содержание кислых изоформ лишь немного превосходило этот показатель в референтном препарате. Наиболее гомогенный препарат был получен, как и ожидалось, при максимальной скорости протока питательной среды (табл. 5). Наиболее близкий к референтному препарату по содержанию кислых форм целевой белок получали при скорости протока среды $0,75 \text{ сут}^{-1}$.

Таблица 5. Зависимость максимальной концентрации клеток, продуктивности процесса и содержания кислых изоформ от скорости протока питательной среды в ходе перфузионного культивирования (n = 2, диапазон значений обозначает размах)

Максимальная скорость протока питательной среды, 1/сут	Максимальная концентрация клеток, млн./мл	Средняя продуктивность процесса, мг/л	Содержание кислых изоформ, %
0,25	15±1,5	380±15	13,2±0,5
0,5	26±3	510±25	11,6±0,4
0,75	40±3,7	570±30	10,1±0,3
1,0	55±5,2	550±30	9,3±0,3
2,0	92±8,5	490±25	7,5±0,6

Проведение установочного лабораторного процесса

Используя оптимизированные параметры (табл. 6), в лабораторном биореакторе Cultibag 10L с рабочим объёмом 3 л провели установочный процесс культивирования длительностью 31 сутки, в результате которого была более подробно изучена динамика изменения качества целевого белка в течение культивирования. Эта информация имеет критическое значение для определения принципа формирования серий фармацевтической субстанции, из которых затем формируются серии лекарственного препарата. Целевой белок выделяли и очищали по разработанной методике каждые 4 дня, начиная с седьмых суток.

Таблица 6. Оптимизированные параметры процесса культивирования в перфузионном режиме

Параметр процесса	Значение параметра	Способ контроля параметра
Начальная клеточная плотность, млн/мл	0,3±0,03	Счётчик клеток
Температура культивирования, °C	37 – фаза накопления биомассы, 32 – фаза получения продукционных сливов	Контролируемый нагрев основания платформы биореактора
pH	6,9±0,05	Подача углекислого газа / раствора 5% NaOH
DO, %	40±10	1. Изменение частоты качаний платформы биореактора 2. Обогащение газовой смеси кислородом
Ускорение перфузии, 1/сут ²	0,15	Встроенный весовой контроль подачи и отбора среды
Скорость перфузии, 1/сут	0,75	то же
Скорость блидинга, 1/сут	0,1	то же

Было показано, что белок, экспрессируемый на этапе накопления биомассы, как минимум по двум параметрам – содержанию кислых изоформ и форм с неспаренным цистеином – имеет существенные отличия от белка, получаемого во время стационарной фазы процесса. На этом основании целесообразно формировать серии субстанции, не включая в них продукт, образующийся до 7-10 суток процесса. Более точное определение начала истинно продукционного периода необходимо провести на этапах освоения технологии в пилотном и промышленном масштабах.

На основании полученных данных был скорректирован целевой диапазон таких показателей качества целевого продукта, как уровень изомеризации аспарагина и уровень

форм с неспаренным цистеином. В ходе проведённых исследований не было выявлено параметров процесса, с помощью которых можно было бы эффективно повлиять на уровень этих показателей. Кроме того, полученные отклонения от первичного целевого диапазона оказались не драматичными, в результате чего они были признаны допустимыми при условии воспроизводимости в масштабированном процессе культивирования.

Оценка влияния растворённого углекислого газа на ростовые характеристики клеток продуцента

Для обоснованного выбора элементов газовой стратегии при масштабировании техпроцесса в пилотный и промышленный биореакторы необходимо прежде всего понимать, каковы допустимые пределы концентрации растворённого CO₂ в культуральной среде и какова чувствительность культуры клеток к экстремальным значениям pCO₂ на различных этапах процесса культивирования.

Проведенное исследование показало, что культура клеток СНО 11А8 приобретает устойчивость к высокому pCO₂ уже на поздней экспоненциальной стадии развития при периодическом культивировании, а в устоявшемся перфузионном процессе 20%-ная концентрация CO₂ практически не снижает жизнеспособности клеток и выхода целевого продукта (табл. 8). Напротив, низкое содержание углекислого газа (1%) приводит к изменению метаболизма лактата, его накоплению в среде и, как следствие, к резкому снижению жизнеспособности и продуктивности культуры. В начальный период культивирования, пока концентрация клеток еще не настолько высока, чтобы они могли насытить среду аутогенным CO₂, необходимо в первую очередь организовать бесперебойную подачу углекислого газа, не допуская его выдувания из среды, что актуально не только для промышленных, но и для лабораторных реакторов.

Таблица 8. Сравнение основных параметров процессов культивирования с различной концентрацией растворенного CO₂ (n = 2, диапазон значений обозначает размах).

Наименование параметра	Значение параметра в контрольном процессе	Значение параметра в случае инициации CO ₂ -стресса при концентрации клеток, млн.кл/мл			
		1,5		5	
Концентрация CO ₂ , %	5	1	20	1	20
Максимальная удельная скорость роста, сут ⁻¹	1,32±1,1	0,78±0,07	1,12±0,1	1,34±1,12	1,3±1,12
Максимальная концентрация клеток, млн./мл	20±1,1	12±0,5	16±0,7	19±1	19±1
Жизнеспособность клеток на 7 сутки, %	98	96	94	96	95
Концентрация лактата на 7 сутки, г/л	2,0±0,2	7,8±0,7	4,1±0,4	4,6±0,5	2,3±0,3

Масштабирование разработанного процесса до объёма пилотного производства

В рамках масштабирования процесса культивирования был проведён перенос технологии из волнового перфузионного биореактора Cultibag в цилиндрический биореактор с верхнеприводной мешалкой SUB 100 (Thermo Fisher Scientific, США, максимальный рабочий объём суспензии – 100 л), совмещённый с выносной перфузионной системой ATF6 (Repligen, США). Было проведено два культивирования длительностью 29 суток в пилотном реакторе с рабочим объёмом суспензии 50 л. Показано, что ростовые характеристики клеток, а также метаболические и продукционные

показатели изменяются в среднем не более чем на 15% при переходе из лабораторных биореакторов в пилотные установки (рис. 8, 9). В стационарной фазе процесса заметно небольшое снижение концентрации клеток, их жизнеспособности и, как следствие, продуктивности, что может быть связано с более жёсткими условиями культивирования в пилотном биореакторе, в частности, с использованием микробарботёра и более высоких линейных скоростей перемешивающего устройства.

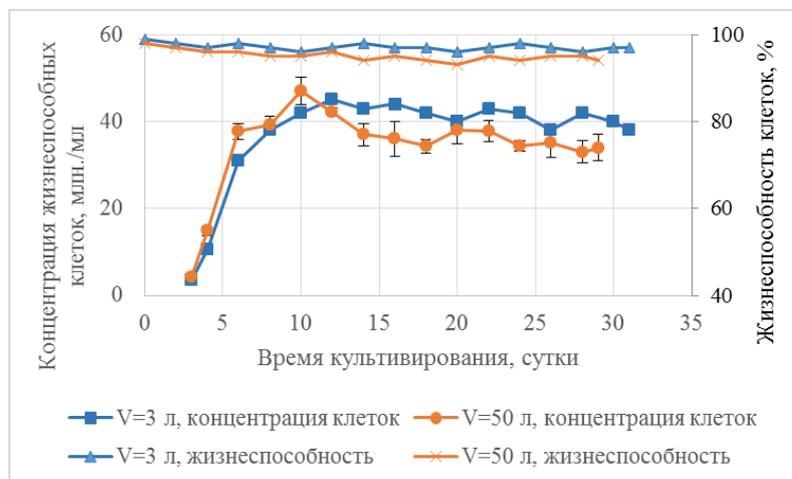


Рисунок 8. Кривые роста и жизнеспособности клеток клона СНО 11А8 при культивировании в лабораторном и пилотном биореакторах (для процесса в объёме 50 литров $n = 2$, предел погрешностей обозначает размах)

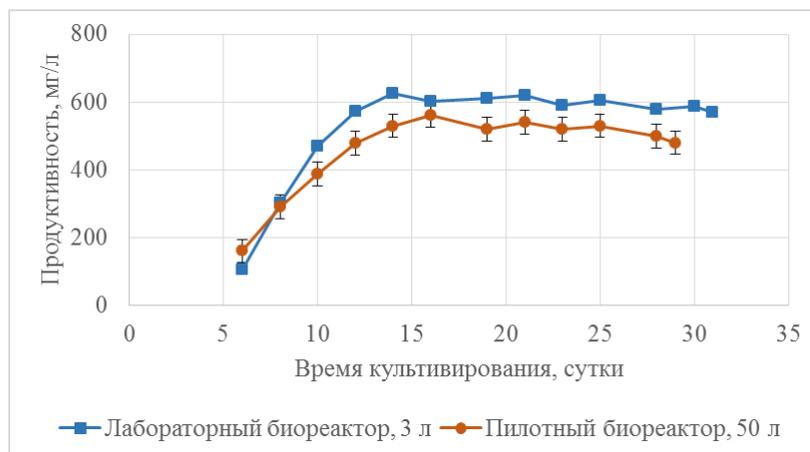


Рисунок 9. Кривая продуктивности при культивировании клеток клона СНО 11А8 в лабораторном и пилотном биореакторах (для процесса в объёме 50 литров $n = 2$, предел погрешностей обозначает размах)

Технологическая схема производства лекарственного препарата на основе моноклонального антитела GNR044

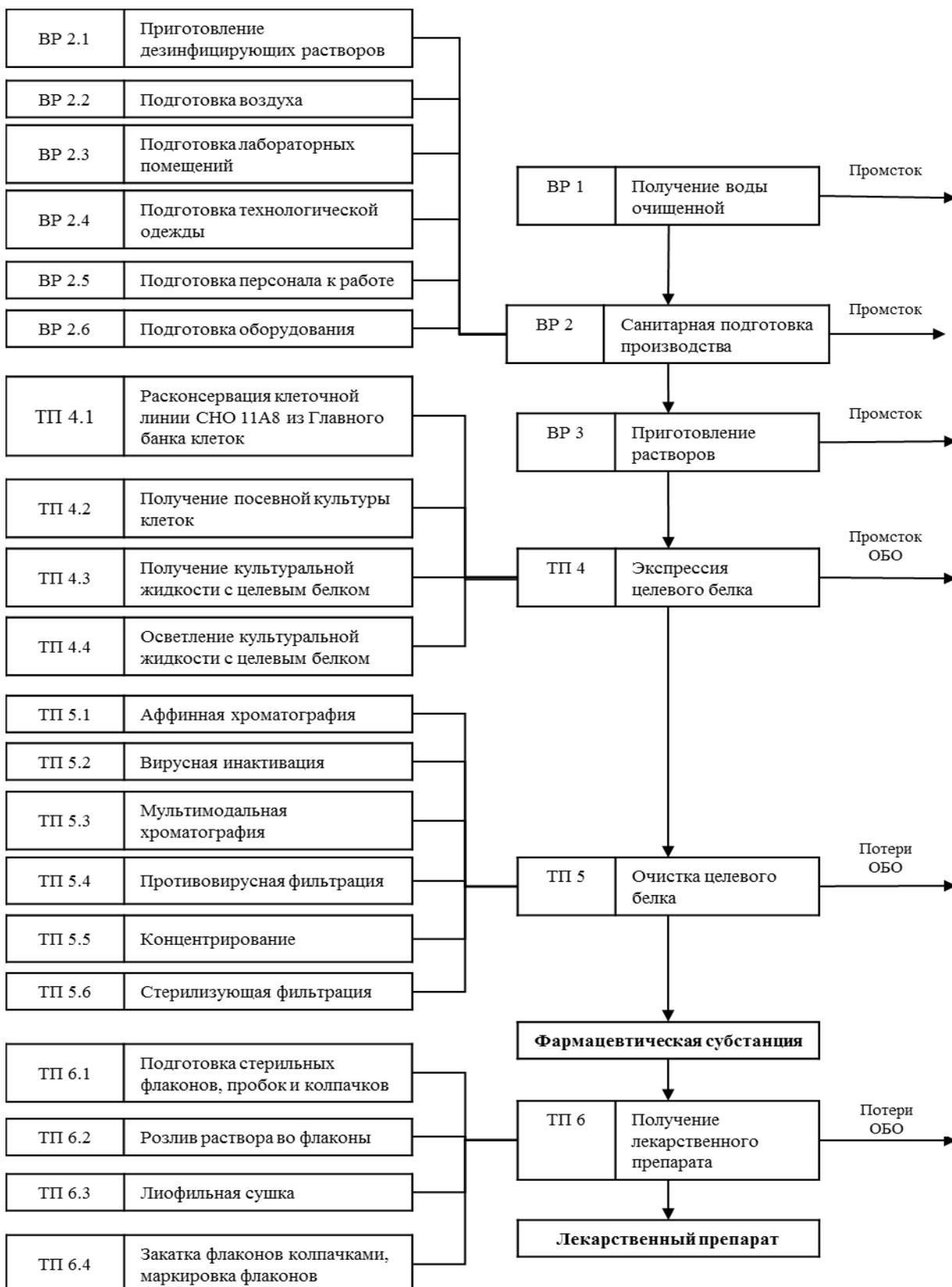


Рисунок 10. Технологическая схема производства лекарственного препарата на основе моноклонального антитела GNR044

В табл. 9 представлены некоторые технико-экономические показатели процесса производства лекарственного препарата на основе моноклонального антитела GNR044. Расчёты приведены для пилотного и промышленного биореакторов SUB100 и SUB1000. Из расчётов следует, что с использованием одного пилотного биореактора SUB100 с рабочим объёмом суспензии 100 л при полной годовой загрузке можно произвести от 8,0 до 9,3 кг очищенного целевого антитела в зависимости от продолжительности процесса культивирования. Как показали проведённые исследования, продолжительность разработанного процесса составляет минимум 30 суток, по окончании которых не наблюдается тенденции к гибели клеток или снижению продуктивности. Таким образом, потенциально длительность процесса может составить от одного до нескольких месяцев. При увеличении продолжительности культивирования снижается относительная длительность начальной низкопродуктивной фазы накопления биомассы и возрастает средняя продуктивность процесса, что приводит к большему годовому выходу целевого белка и снижению его себестоимости. Как видно из таблицы, наибольший экономический эффект (+16%) оказывает увеличение продолжительности процесса с одного до двух месяцев. Подобная ситуация наблюдается и для промышленного биореактора SUB1000, годовая производительность которого составляет 40,1-48,2 кг по очищенному белку при рабочем объёме 500 л и 80,3-96,4 кг при рабочем объёме 1000 л.

Себестоимость лекарственного препарата на основе моноклонального антитела GNR044, рассчитанная с учётом затрат на сырьё, материалы, амортизационные отчисления и фонд оплаты труда составляет 14700-16360 руб./г в зависимости от продолжительности процесса культивирования. Предельная отпускная цена референтного препарата составляет 84033 руб./г из расчёта предельной отпускной цены согласно ЖНВЛП 16806,56 руб./флакон, во флаконе содержится 200 мг. Таким образом, себестоимость производства лекарственного препарата GNR044 составляет 17,5-19,5% от предельной отпускной цены на омализумаб, что делает разработанную технологию экономически эффективной.

Таблица 9. Технико-экономические показатели процесса производства лекарственного препарата на основе моноклонального антитела GNR044

Наименование показателя	Значение показателя при рабочем объёме культивирования, л								
	100			500			1000		
Продолжительность процесса культивирования, сут	30	60	90	30	60	90	30	60	90
Выход целевого белка за процесс*, кг	0,67	1,56	2,41	3,34	7,77	12,1	6,69	15,6	24,1
Годовой выход целевого белка, кг/год	8,04	9,33	9,64	40,1	46,6	48,2	80,3	93,3	96,4
Объём затраченной питательной среды, т/год	22,9	25,0	25,4	114,7	124,9	126,7	229,5	249,8	253,5
Себестоимость целевого белка, тыс. руб./г	15,99	15,23	14,86	16,36	15,17	14,70	16,34	15,13	14,75

* При условии исключения первых четырёх перфузатов, в которых содержится белок, не соответствующий целевому профилю

ВЫВОДЫ

1. Разработан высокопроизводительный процесс непрерывного перфузионного культивирования клеточной линии СНО 11А8 минимальной продолжительностью 30 суток, позволяющий получать моноклональное антитело GNR044, потенциальный биоаналог омализумаба, с продуктивностью 410 ± 30 мг/л/сут.

2. В рамках подхода Quality by Design идентифицированы критические показатели качества целевого белка и критические параметры процесса культивирования клон-продуцента. На основании изучения критичности показателей качества антитела GNR044 и анализа серий референтного препарата определены целевые диапазоны показателей качества антитела GNR044. На основании анализа критических параметров процесса определены основные шаги разработки технологии культивирования.

3. Обоснована скорость протока питательной среды $0,75$ сут⁻¹, позволяющая получать антитело GNR044 с содержанием кислых изоформ на уровне $10,1 \pm 0,3\%$, что соответствует профилю референтного препарата. Также показано, что достижение данных показателей в режиме фэд-батч связано с существенным падением экономической эффективности процесса из-за необходимости ранней остановки культивирования. Таким образом, дополнительно обосновано использование перфузионного культивирования в качестве производственного процесса.

4. Обоснован режим ускорения протока питательной среды в начальной стадии процесса $0,15$ сут⁻², позволяющий эффективно выводить клеточную культуру в фазу стационарного роста.

5. Обоснован режим непрерывного отбора клеточной суспензии (блидинга) со скоростью $0,1$ сут⁻¹, позволяющий стабилизировать рост культуры и выход белка в стационарной фазе процесса культивирования.

6. На основе разработанной технологии культивирования произведены серии фармацевтической субстанции GNR044, прошедшие контроль качества согласно проекта ФСП и использованные в ходе доклинических испытаний ЛС.

7. Проведено масштабирование технологии культивирования в биореакторах пилотного масштаба SUB100 с выносной системой перфузии ATF2. Показано, что ростовые характеристики клеток, а также метаболические и продукционные показатели изменяются в среднем не более чем на 15% при переходе из лабораторных биореакторов в пилотные установки. В стационарной фазе процесса заметно небольшое снижение концентрации клеток, их жизнеспособности и, как следствие, продуктивности, что может быть связано с более жесткими условиями культивирования в пилотном биореакторе, в частности, с использованием микробарботёра и более высоких линейных скоростей перемешивающего устройства.

В результате проведённого масштабирования процесса разработан опытно-промышленный регламент ОПП №89761464-47-16, на основании которого получены серии лекарственного препарата GNR044 для проведения клинических испытаний.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Разработанная технология производства фармацевтической субстанции антитела GNR044, потенциального биоаналога омализумаба, использована при наработке серий ФС для проведения доклинических и клинических испытаний.

2. Разработанная технология использована при составлении лабораторного и опытно-промышленного регламентов (ОПП №89761464-47-16) на производство фармацевтической субстанции моноклонального антитела GNR044, потенциального биоаналога омализумаба.

3. Результаты проведённых исследований использованы при написании заключительного отчёта о выполнении НИОКР от 03.04.2017 года

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Статьи

1. Морозов, А. Н. Разработка процесса непрерывного культивирования клеток СНО – продуцентов рекомбинантного фактора свёртывания крови VIII / А. Н. Морозов, Г. Д. Сидельников, И. М. Емельянов, К. Е. Лапшин, Д. Р. Алимова // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. - 2015. - № 4 (56). - С. 26-31.
2. Морозов, А. Н. Оптимизация ускорения перфузии – ключевой этап разработки высокопроизводительного перфузионного культивирования клеток СНО / А. Н. Морозов, З. В. Захаров, Р.А. Кочелабов, Д. В. Тюпа, А. В. Исеркапов, Р. И. Фарсиева, М. А. Смолон // Биотехнология. - 2016. - Т. 32, № 4. - С. 60-67.
3. Морозов, А. Н. Влияние способа культивирования клеток СНО на уровень кислых изоформ моноклонального антитела, потенциального биоаналога омализумаба / А. Н. Морозов, З. В. Захаров, Д. В. Тюпа, Р. А. Кочелабов, И. М. Емельянов, Р. И. Фарсиева, М. Б. Исакова // Биофармацевтический журнал. - 2017. - Т. 9, № 5. - С. 11-16.
4. Тюпа, Д. В. Влияние экстремальных концентраций растворённого CO₂ на рост и метаболические характеристики клеток СНО в периодических и непрерывных процессах / Д. В. Тюпа, А. Н. Морозов, З. В. Захаров, С. В. Калёнов, Р. А. Кочелабов, И. М. Емельянов // Бутлеровские сообщения. - 2017. - №5. Т. 50. - С. 126-133.
5. Стратонова, Н. В. Методические подходы к валидации технологических процессов получения терапевтических рекомбинантных белков на основе концепции «Quality by Design» / Н. В. Стратонова, А. С. Лисов, А. Н. Морозов, Д. В. Тюпа, Р. А. Хамитов // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2018. – Т. 18, № 3. – С. 175-183.

Тезисы конференций

Морозов, А. Н. Perfusion и Fed-batch: сравнение двух стратегий культивирования эукариотических продуцентов рекомбинантных белков / А. Н. Морозов, К. Е. Лапшин, И. М. Емельянов, М. А. Завальный // Биотехнология: состояние и перспективы развития: тез. докл. междунар. конгр., 19-22 марта 2013 г. - Москва. - 2013. - С. 44.

Патент

Пат. 2672318 Российская Федерация. Способ получения моноклональных антител терапевтического назначения с помощью непрерывного культивирования клеток СНО / Морозов А.Н., Захаров З.В., Тюпа Д.В., Кочелабов Р.А.; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «Международный Биотехнологический Центр «Генериум». – N 2017132524 ; заявл. 19.09.2017 ; опубл. 13.11.2018, Бюл. N 32.