

ООО «Международный Биотехнологический Центр «Генериум»

*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)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
профессор, доктор медицинских наук  
Хамитов Равиль Авгатович

Вольгинский – 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Бронхиальная астма и иммуноглобулин класса E.....	13
1.2. Омализумаб – строение и функции.....	16
1.3. Современные подходы к разработке биоаналогов.....	18
1.4. Критические показатели качества омализумаба.....	25
1.5. Клетки СНО – основной инструмент для производства моноклональных антител .....	39
1.6. Способы культивирования клеток млекопитающих .....	42
1.7. Перфузионные процессы культивирования клеток млекопитающих	45
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	65
2.1. Материалы и методы .....	65
2.2. Оценка критичности показателей качества разрабатываемого препарата .....	73
2.3. Определение критических параметров процесса получения культуральной жидкости с целевым белком .....	79
2.4. Выбор состава питательной среды.....	83
2.5. Оптимизация режима ускорения протока питательной среды .....	87
2.6. Выбор скорости блидинга.....	96
2.7. Оптимизация профиля изоформ целевого белка с различными зарядами .....	99
2.8. Проведение установочного лабораторного процесса .....	108
2.9. Оценка влияния растворённого углекислого газа на ростовые характеристики клеток продуцента .....	112
2.10. Масштабирование разработанного процесса до объёма пилотного производства.....	121

2.11. Технологическая схема производства лекарственного препарата на основе моноклонального антитела GNR044 .....	124
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	129
4. ВЫВОДЫ .....	136
5. ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАУЧНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	138
6. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ .....	139
7. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	140
8. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ .....	157
9. ПРИЛОЖЕНИЕ .....	159
Приложение А. Опытно-промышленный регламент на производство фармацевтической субстанции моноклонального антитела GNR044, потенциального биоаналога омализумаба .....	159
Приложение Б. Уведомление о приёме и регистрации заявки на патент на изобретение «Способ получения моноклональных антител терапевтического назначения с помощью непрерывного культивирования клеток CHO» .....	160
Приложение В. Справка о депонировании клеточной линии CHO 11A8-GNR044 .....	161
Приложение Г. Разрешение на проведение клинических исследований препарата Омализумаб производства компании «Генериум» .....	162

## СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- БГФ – буфер готовой формы;
- БЛС – биологическое лекарственное средство;
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
- ЕМА – Европейское Медицинское Агентство;
- ЕС – Европейский Союз;
- КЖ – культуральная жидкость;
- КПК – критический показатель качества (англ. – CQA);
- КПП – критический параметр процесса (англ. – CPP);
- ЛП – лекарственный препарат;
- УСП – удельная скорость перфузии;
- ФНО – фактор некроза опухоли;
- ФС – фармацевтическая субстанция;
- ФСП – фармацевтическая статья предприятия;
- ЦПП – целевой профиль продукта (англ. – TRP);
- ADCC – антителозависимая цитотоксичность;
- CDC – комплемент-зависимая цитотоксичность;
- CDR – complementarity determining region; участок, определяющий комплементарность антитела;
- СЕХ – катионообменная хроматография;
- СНО – chinese hamster ovary, яичник китайского хомячка;
- CPP – critical process parameter, критический параметр процесса;
- CQA – critical quality attribute, критический показатель качества;
- CV – column volume, объём колонки (хроматографической);
- DO – dissolved oxygen, концентрация растворённого кислорода;
- IgE – иммуноглобулин класса E;
- IVC – integral viable cell concentration, интегральная плотность жизнеспособных клеток;
- TRP (QTRP) – (quality) target product profile, целевой профиль (качества) продукта;
- QbD – Quality by Design.

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность 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% [99, 124]. 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. [7].

Атопия является серьёзной проблемой также и для ветеринарной медицины. Заболеваемость атопическим дерматитом у собак, по разным данным, достигает 10-15% [105, 108]. Аллергическая астма у кошек и крапивница у лошадей имеют большое распространение и представляют собой значительную ветеринарную проблему [67].

Ключевую роль в формировании аллергических реакций у людей и животных играет иммуноглобулин E, 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 [55].

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 E 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 [81], 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 [11, 14, 15, 103, 125]. 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 оригинальных 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 оригинального 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 отчасти найдены на базе ООО «МБЦ «Генериум» в рамках разработки технологии получения группы биоаналогов моноклональных антител.

## Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования являлось создание технологии непрерывного суспензионного культивирования клеток *CHO*, продуцирующих моноклональное гуманизированное 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 клона-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 оригинального 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 работы

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 подана заявка на патент РФ №2017132524 на изобретение «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 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, первую фазу клинических испытаний.

#### Личное участие автора в получении результатов

Автор выполнял работы по выбору состава питательной среды и оптимизации режима протока 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.

## Методология и методы исследования

Методология исследования соответствовала поставленным задачам. Предметом исследования являлась технология непрерывного культивирования клеток СНО, экспрессирующих моноклональное антитело к иммуноглобулину Е.

В работе использовали методы периодического и непрерывного культивирования культур клеток, хроматографические методы очистки белковых молекул, физико-химические методы анализа биопрепаратов, методы оценки рисков, а также методы статистической обработки данных.

## Положения, 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  $410 \pm 30$  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 объемом суспензии клеток 3 литра в вертикальный

биореактор с мешалкой и внешним перфузионным устройством с рабочим объёмом суспензии клеток 100 литров.

### Степень достоверности и апробация результатов

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, подана 1 заявка на патент.

### 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.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Бронхиальная астма и иммуноглобулин класса E

Бронхиальная астма – одно из самых распространённых хронических заболеваний в мире. Число зарегистрированных больных превышает 300 млн. человек, варьируя от 1 до 18% населения в различных регионах мира [41]. В России бронхиальной астмой страдают от 4 до 8% взрослого населения и до 5-10% детей [143]. Общее число больных бронхиальной астмой в стране приближается к 12 млн. человек, из числа которых около 1,7 млн. больных имеют тяжёлую форму заболевания. По статистике Минздрава РФ число пациентов с бронхиальной астмой ежегодно увеличивается в среднем на 7% [143].

Атопическая (аллергическая) бронхиальная астма – хроническое мультифакторное заболевание, развивающееся в результате комплексного взаимодействия генотипа с факторами окружающей среды (аллергенами, респираторными вирусами и др.) и характеризующееся переменными и повторяющимися симптомами, обструкцией дыхательных путей, бронхов, и воспалением.

Иммуноглобулины класса E играют ключевую роль в формировании аллергических реакций в дыхательных путях при бронхиальной астме. Несмотря на разнообразие фенотипов бронхиальной астмы, на аллергическую IgE-обусловленную астму приходится более 80% случаев заболевания у детей и более 50% – у взрослых [142].

Иммуноглобулин класса E – изотип иммуноглобулина, содержащий тяжёлую цепь  $\epsilon$  и являющийся мономером с пятью доменами, характерными для иммуноглобулинов (рисунок 1) [129]. В норме IgE присутствует в плазме в очень низких концентрациях (50-200 нг/мл) по сравнению с другими изотипами (1-10 мг/мл) и его уровень жёстко регулируется. Период полужизни IgE – также наименьший по сравнению с другими изотипами

иммуноглобулинов – порядка 48 часов у человека и 5-12 часов у мыши (по сравнению с 20 и 10 днями у человека и мыши, соответственно для IgG) [129]. Концентрация IgE может возрасти в 10 раз у пациентов с аллергическими заболеваниями.

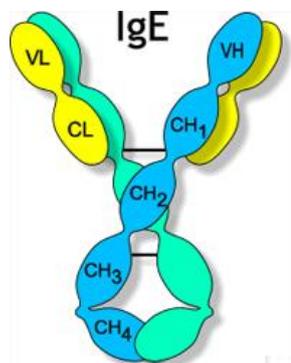


Рисунок 1 - Структура иммуноглобулина класса E

IgE существует в двух формах: в виде мембран-связанного (на поверхности В-клеток, прошедших переключение синтеза антител на IgE) и секретируемого, экспрессируемого плазматическими клетками. Мембран-связанный IgE способствует связыванию антигена и его презентации В-клетками, а также совместно с коstimуляторными молекулами инициирует пролиферацию и дифференциацию В-клеток.

После секреции, IgE связывается со своими рецепторами (FcεR): высокоаффинным рецептором (FcεRI) и низкоаффинным рецептором CD23 (FcεRII) [44]. FcεRI экспрессируется на поверхности тучных клеток и базофилов, и его активация при связывании с IgE приводит к дегрануляции клеток и выработке эйкозаноидов (простагландины, тромбоксаны, лейкотриены) и цитокинов [129]. У человека рецептор FcεRI также экспрессируется дендритными клетками и макрофагами, где его активация индуцирует интернализацию IgE-связанных антигенов и выработку цитокинов, способствующих иммунному ответу Th2 типа.

FcεRII экспрессируется В-клетками, на которых он регулирует выработку IgE и способствует процессингу и презентации антигенов. FcεRII,

экспрессируемый макрофагами и эпителиальными клетками, способствует фагоцитозу комплексов IgE с антигеном.

Несмотря на то, что IgE играет ключевую роль в защите организма от гельминтов, гиперактивация IgE-опосредованного иммунного ответа на часто встречающиеся, безвредные антигены окружающей среды, может приводить к развитию различных патологий, таких как аллергическая астма, аллергический ринит, атопический дерматит и другие [55].

Развитию аллергического воспаления предшествует фаза сенсibilизации, приводящая к образованию антиген-специфичных IgE, В- и Т-лимфоцитов (рисунок 2) [85].

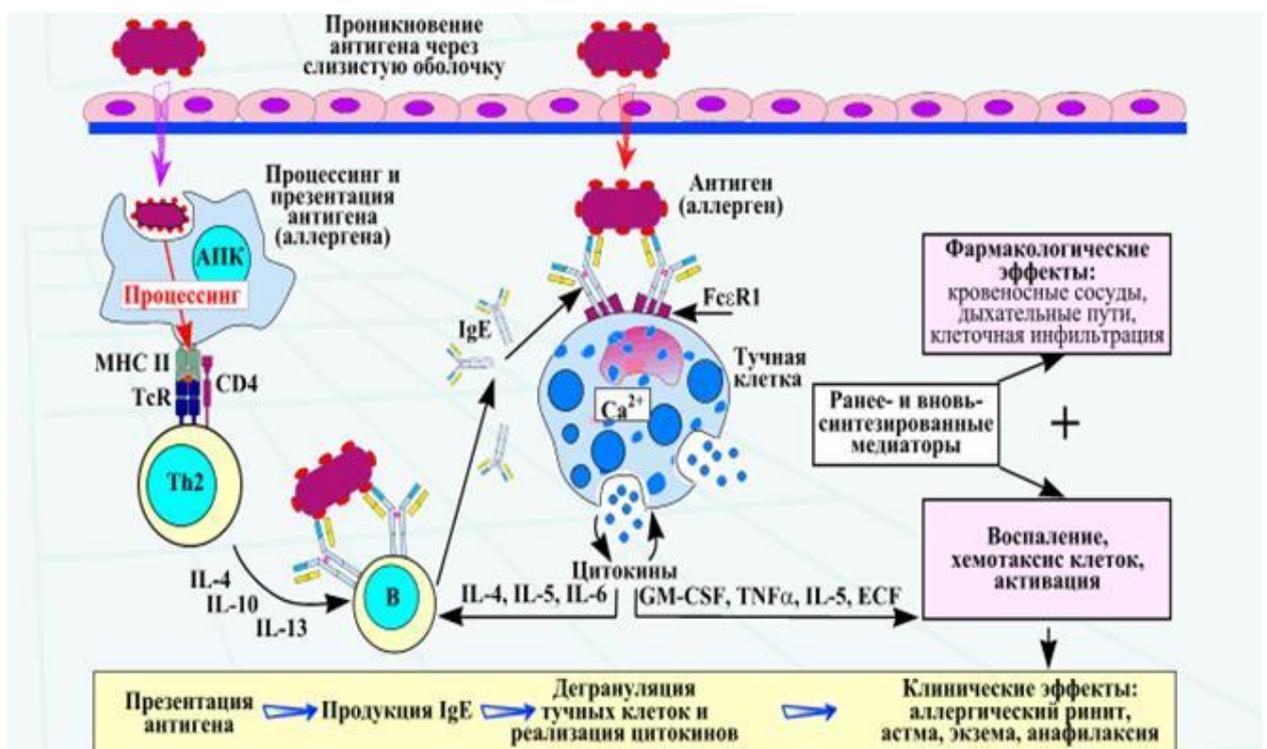


Рисунок 2 - Схема развития аллергического иммунного ответа

Интерлейкин-4 (ИЛ-4) и интерлейкин-13 (ИЛ-13), секретируемые Th2 клетками, индуцируют переключение на синтез IgE и клональную экспансию популяций наивных и IgE+ В-клеток памяти. После сенсibilизации симптомы аллергии отсутствуют до повторного контакта с аллергеном. При повторном контакте с антигеном развивается реакция гиперчувствительности I типа, называемая ранней фазой аллергии (первые 15-30 минут после

воздействия аллергена) (рисунок 2). Связывание аллергена с IgE на поверхности тучных клеток и базофилов приводит к их дегрануляции и выбросу медиаторов, приводящих к развитию симптомов аллергии [85]. В течение последующих 6-12 часов происходит прогрессирующая инфильтрация в ткани воспалительных клеток (нейтрофилы, эозинофилы и мононуклеарные клетки), называемая поздней фазой, которая характеризуется клиническими проявлениями воспаления.

## 1.2. Омализумаб – строение и функции

Омализумаб – рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело IgG1к, селективно связывающееся с иммуноглобулином E (IgE) человека, производимое по технологии рекомбинантной ДНК в клетках яичников китайского хомячка (СНО). Эффективность омализумаба обеспечивается гипервариабельными участками мышиного антитела, составляющими менее 5% его массы. Оставшиеся 95% - полностью человеческая часть антитела, что обуславливает высокую безопасность препарата в отношении иммуногенности у принимающих его больных (рисунок 3).

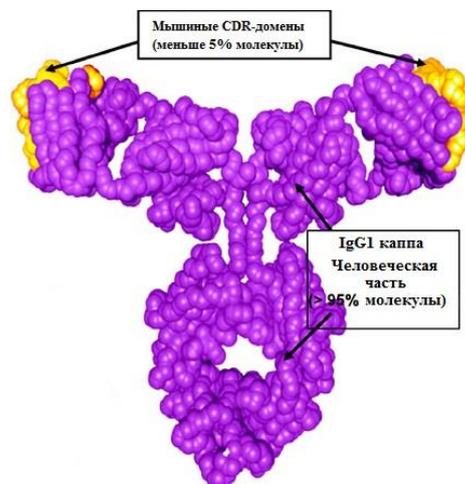


Рисунок 3 - Соотношение между мышиной и человеческой частями молекулы омализумаба

Омализумаб связывается и образует комплекс со свободным IgE в плазме человека, предотвращая его связывание с высокоаффинными (FcεRI) рецепторами на поверхности тучных клеток, базофилов и антигенпрезентирующих клеток. Снижение количества поверхностно-связанного IgE на клетках, имеющих рецепторы FcεRI, лимитирует их дегрануляцию и высвобождение медиаторов аллергического ответа, а также приводит к снижению экспрессии самого рецептора, уменьшая вероятность дальнейшей активации базофилов и тучных клеток свободными молекулами IgE [68]. За счёт связывания с тем же (Cε3) доменом на IgE, что и FcγRI, омализумаб не вызывает анафилактического шока.

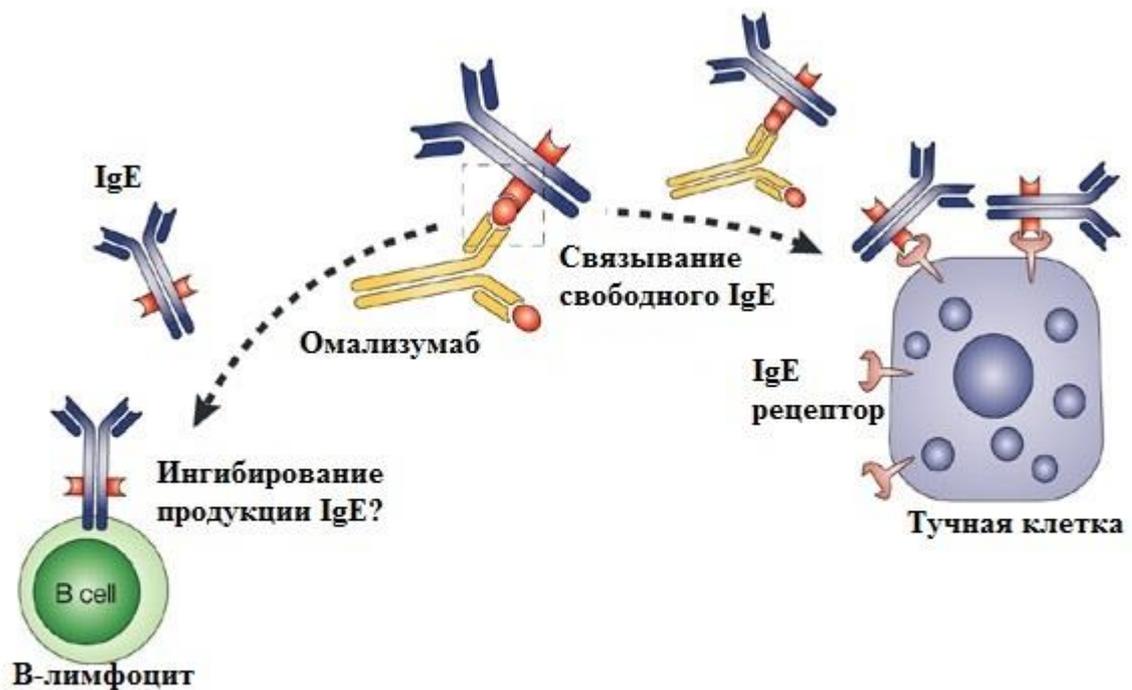


Рисунок 4 - Омализумаб предотвращает связывание IgE с высокоаффинным рецептором на базофилах и тучных клетках

При терапии омализумабом у пациентов с atopической бронхиальной астмой отмечается заметное уменьшение количества FcεRI-рецепторов на поверхности базофилов. *In vitro* в базофилах, выделенных у пациентов,

получавших терапию омализумабом, наблюдалось выраженное снижение (приблизительно на 90%) выброса гистамина после стимуляции аллергеном по сравнению с данными, полученными до начала терапии.

Омализумаб является первым и пока единственным биопрепаратом для терапии аллергической астмы; применяется с 2002 г. Выпускается в форме лиофилизата для приготовления раствора для подкожного введения 150 мг/флакон, а также в виде раствора для подкожного введения 150 мг/мл в преднаполненных шприцах. Субстанция омализумаба производится с использованием процесса периодического культивирования клеток СНО с подпиткой (фед-батч процесс) [31]. Хроматографическая очистка целевого белка состоит из трёх последовательных стадий: аффинной, катионообменной и анионообменной. Элюат, полученный с последней хроматографической стадии, затем концентрируется ультрафильтрацией/диафильтрацией, стерилизуется посредством фильтрации через фильтр с размером пор 0,22 мкм и хранится при 2-8°C или минус 20°C до стадии получения лекарственного препарата. Лекарственный препарат получают лиофилизацией раствора субстанции в стеклянных флаконах объёмом 5 мл в контролируемых условиях с укупориванием пробок в стерильной камере в атмосфере азота.

В России омализумаб зарегистрирован под торговым наименованием «Ксолар» (производитель Новартис Фарма АГ, Швейцария). Российских и мировых аналогов препарата омализумаб в настоящее время не существует.

Таким образом, разработка биоаналога омализумаба является актуальной задачей для отечественной биофармацевтики.

### 1.3. Современные подходы к разработке биоаналогов

Биологические лекарственные средства (БЛС) – один из самых быстрорастущих сегментов фармацевтической промышленности. За

последние 20 лет БЛС позволили внедрить в медицинскую практику новые виды терапии таких жизнеугрожающих и редких заболеваний, как рак, диабет, анемия, ревматоидный артрит, рассеянный склероз и т.д. Биологические лекарственные средства включают в себя большой диапазон терапевтических субстанций, таких как рекомбинантные гормоны, факторы роста, продукты на основе моноклональных антител, рекомбинантные вакцины, а также продукты генной и клеточной терапии.

Однако высокая цена на эти препараты и, соответственно, большая нагрузка на бюджеты здравоохранения во всём мире делает актуальной разработку и внедрение более дешёвых аналогов оригинальных БЛС [117] (в российской правовой терминологии такие препараты носят название *биоаналогов*). Разработка и вывод на рынок биоаналогов стали возможными лишь в последние 5-7 лет благодаря окончанию срока действия патентов на многие биологические препараты первой волны, в число которых входит и омализумаб, (окончание срока действия патента на омализумаб на территории РФ наступило в 2017 году).

В отличие от довольно простых дженериков, т.е. аналогов химически-синтезируемых лекарств, процесс разработки биоаналогов гораздо более сложен. Это вызвано, прежде всего, тем, что БЛС:

- ✓ отличаются сложной молекулярной структурой;
- ✓ производятся с помощью культур клеток или целых организмов;
- ✓ высокой зависимостью профиля продукта от условий проведения производственного процесса.

Кроме того, по сравнению с дженериками, гораздо бóльшие усилия и ресурсы должны быть приложены для доказательства сопоставимости физико-химических, фармакокинетических и фармакодинамических характеристик биоаналогичного и оригинального препаратов. Посттрансляционные модификации целевой молекулы и её иммуногенность вызывают основные опасения при экспертизе биоаналогов.

Как известно, посттрансляционные модификации (ПТМ) возникают вследствие гликозилирования, окисления, дезамидирования, отщепления лабильных сайтов, агрегации, фосфорилирования и др. [88]. Поскольку многие из этих модификаций могут влиять на безопасность и эффективность молекул, выявление наиболее значимых критических показателей качества целевого белка (КПК) – важная стартовая точка в ходе разработки биоаналогичного ЛС.

*Критический показатель качества* – это физическое, химическое, биологическое или микробиологическое свойство или характеристика, которая должна находиться в соответствующем диапазоне, чтобы обеспечивать желаемое качество продукта [63, 118, 33].

Понимание критических показателей качества на ранней стадии разработки БЛС чрезвычайно важно. Изучение качества продукта, проводимое на стадиях получения минипулов, клонов или разработки процесса производства может помочь оценить эффективность и безопасность различных модификаций молекулы в *in vitro* и *in vivo* исследованиях. В результате этих исследований разработка молекулы с желаемым профилем качества может быть упрощена. Ниже (Таблица 1) в качестве примера показаны КПК моноклонального антитела ритуксимаб [46].

Таблица 1 - Критические показатели качества ритуксимаба и оценка их воздействия на функции целевой молекулы [46]

Параметр качества биоаналога ритуксимаба	Воздействие параметра на функции молекулы
Дефукозилирование	Дефукозилированные гликаны на Fc-части улучшают антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC)
Терминальные галактозы	Дегалактозилирование приводит к значительному уменьшению комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC)
Высокоманнозные гликаны	Высокоманнозные гликаны могут вызывать быстрое выведение антитела из кровотока за счёт взаимодействия с маннозными рецепторами
Сиаловые кислоты	Сиалированные гликаны могут увеличивать иммуногенность белка
Окисление метионина	Мет-252 попадает в регион, связывающий FcRn, и его окисление изменяет период полувыведения молекулы
Фрагментирование	Фрагментация hinge-региона ведёт к конформационным изменениям (увеличение иммуногенности и уменьшение биологической активности)
Олигомеризация	Ковалентная и нековалентная агрегация может приводить к падению биологической активности
С-концевые лизины	Не имеют биологического или функционального значения
Н-концевой пироглютамат	Представляет собой спонтанное физико-химическое превращение и не имеет биологического или функционального значения
Остаточные белки, остаточная ДНК клетки-хозяина, остаточный белок А	Надёжный и эффективный процесс убирает данные примеси до разрешённого уровня, при котором они не имеют биологического или функционального значения

Идентификация КПК является неотъемлемой частью современного подхода к разработке БЛС, имеющего название *Quality by Design (QbD)*. QbD – это системный подход к разработке лекарственных препаратов, основывающийся на надёжных научных данных и глубокой оценке рисков. В методических указаниях ICH Q8 «Фармацевтическая разработка» концепция QbD позиционирована как улучшенный подход к фармразработке. В

противоположность традиционному подходу, концепция QbD изначально предлагает сфокусировать внимание на готовом продукте и его потребителе (пациенте). По сравнению с традиционным, улучшенный подход к разработке лекарственного средства дополнительно включает следующие элементы [139]:

- определение свойств сырья, которые могут оказать влияние на критические параметры качества ЛС с помощью углублённой оценки рисков;
- определение степени влияния изменчивости сырья и параметров технологического процесса на критические параметры качества с помощью полнофакторного математического моделирования;
- формирование стратегии контроля исходя из результатов комплексной оценки рисков и проведённых экспериментов;
- смещение акцентов с эпизодической ревалидации на непрерывное подтверждение пригодности параметров процесса и организацию выпуска по параметрам.

Одним из ключевых понятий концепции QbD является целевой профиль качества продукта. В случае биоаналогов целевой профиль определяется преимущественно на основе анализа оригинального препарата, поскольку эффективное переключение пациента с оригинального препарата на его биоаналог возможно лишь при максимальном подобии двух ЛС [109, 117].

За последние несколько лет исследования, проведённые в соответствии с принципом QbD, продемонстрировали преимущества системного подхода к разработке биологических ЛС [46]. При этом стоит отметить, что QbD является чрезвычайно гибким подходом, который может быть использован множеством способов, зависящих от уровня развития и компетентности специалистов каждой конкретной компании.

Известно, что биофармацевтическое производство – многоступенчатый процесс, включающий клонирование определённой генетической последовательности в тщательно выбранный экспрессионный вектор, выбор подходящей клеточной экспрессионной системы, культивирование и очистка целевого белка, заканчивая изготовлением лекарственного препарата. И, как уже говорилось, идентификация критических показателей качества продукта – отправная точка разработки БЛС.

Наиболее эффективным является применение КПК-подхода на всём пути разработки, начиная с выбора клона и заканчивая производством и клиническими исследованиями.

Создание высокопродуктивного клона остаётся основным бутылочным горлышком при разработке рекомбинантных белков или моноклональных антител. Идеальная производственная клеточная линия должна быть высокопродуктивной, стабильной, и должна обеспечивать получение продукта с оптимальными характеристиками, включающими:

- минимальная гетерогенность аминокислотной последовательности;
- максимальная функциональная активность;
- воспроизводимый профиль гликозилирования;
- минимальная гетерогенность изоформ с различными зарядами;
- низкий потенциал к агрегации.

Однако в большинстве случаев продуктивность является главным критерием выбора клонов вплоть до самой поздней стадии, когда остаётся небольшое количество кандидатов, которые уже оцениваются по другим параметрам качества, что увеличивает риски разработки. Для снижения этих рисков в ходе выбора клонов и оптимизации процесса используют КПК-подход, позволяющий быстро оценивать качество белка на раннем этапе, определяя судьбу клеточных линий и процессов.

Чрезвычайно большое влияние на КПК продукта оказывает процесс культивирования клеточной линии-производителя, а именно:

- тип процесса культивирования (батч, фэд-батч, перфузия и т.п.);
- параметры процесса культивирования (уровень растворённого кислорода (DO), pH, газовая стратегия, температура);
- состав питательной среды (базовая среда, добавки, режим подпитки);
- уровень вторичных метаболитов (лактата, ионов аммония);
- масштабирование процесса культивирования.

Эти факторы могут существенно влиять на КПК молекулы потенциального биоаналога. Идентифицированные КПК необходимо проверять на каждом этапе разработки продукта. Такой подход делает возможной разработку высококачественного биоаналога без существенного увеличения поставленных сроков.

Например, гликозилирование белка определяется, в основном, на этапе культивирования и практически не изменяется во время выделения и очистки продукта (по крайней мере, для незаряженных гликоформ) [48, 87, 104].

Критические показатели качества, зависящие, прежде всего, от условий культивирования, включают в себя:

- распределение гликанов белка (например, дефукозилированные, высокоманнозные гликаны и т.д.);
- распределение изоформ с различным зарядом (например, дезамидированные, гликированные формы и т.д.);
- и, в меньшей степени, распределение молекул по размерам (например, димерные и агрегированные формы).

Вариабельность и многофакторность, связанные с биологическим процессом культивирования, делают подход QbD довольно сложным, опирающимся на специфичные для конкретной технологии критические параметры процесса (КПП). По определению, критические параметры процесса способны влиять на качество финального продукта или его промежуточных фракций (рисунок 5).

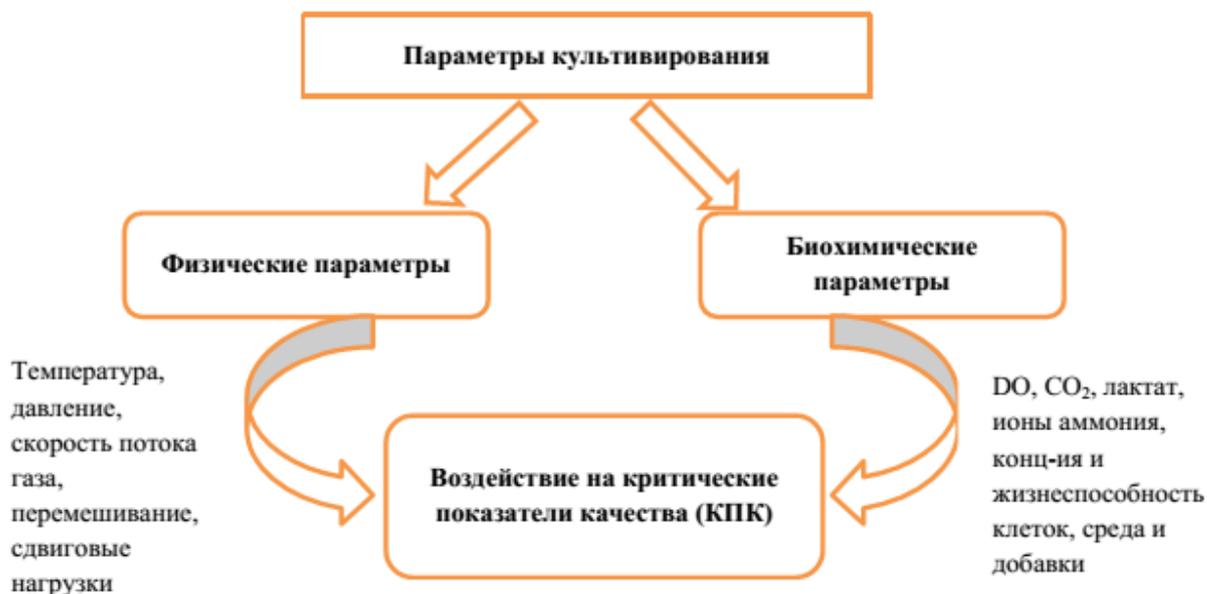


Рисунок 5 - Схема воздействия параметров процесса культивирования на критические показатели качества (КПК)

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

#### 1.4. Критические показатели качества омализумаба

##### 1.4.1. Изомеризация остатков аспарагиновой кислоты

Изучение критичности данного показателя качества была проведена на основе литературных данных, опубликованных разработчиком референтного препарата [10, 122].

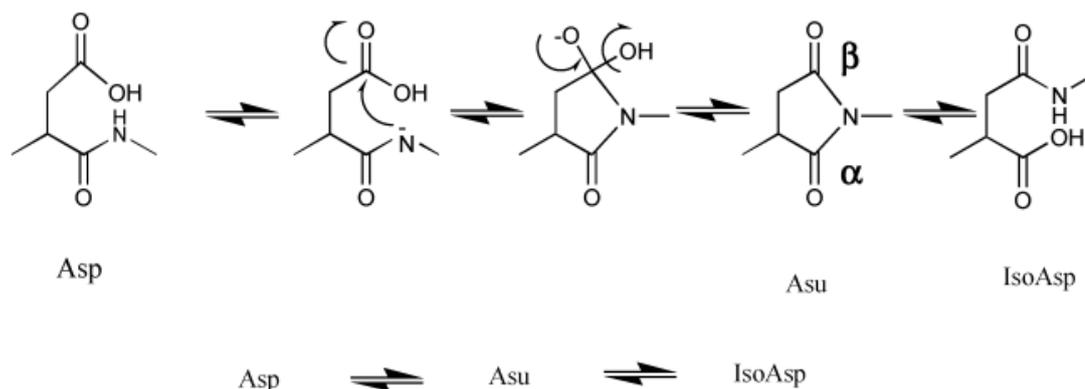


Рисунок 6 - Путь изомеризации остатка аспарагиновой кислоты в пептидах и моноклональных антителах

Неферментативная посттрансляционная модификация остатков аспарагиновой кислоты Asp, приводящая к формированию изоаспартата IsoAsp и циклического имида Asu (рисунок 6), - один из основных путей *in vitro* и *in vivo* деградации белков [123]. Изомеризация Asp вызывает проблему старения белковых молекул, а в случае терапевтических белков может зачастую приводить к потере активности и изменению восприимчивости к протеолизу. Также возможно возникновение аутоиммунного ответа на такие белки [122]. Geiger&Clarke [40] было постулировано, что подверженность изомеризации зависит от локальной гибкости части молекулы, содержащей последовательность Asp-Gly. Аккомодация трёх структурных изоформ молекулы белка требует значительной локальной гибкости пептидного участка. Три изоформы переходят друг в друга, в результате чего достигается равновесие, зависящее от температуры и pH.

Молекула омализумаба содержит последовательность Asp-Gly на участках CDR-L1 (L32-33) и CDR-H2 (H55-56). Однако только для одной из них (L32-33) была установлена сильная тенденция к изомеризации Asp. Разница в восприимчивости к деградации подтверждает роль структур высокого уровня в скорости таких реакций, как изомеризация и дезамидирование.

Положение сайта деградации в регионе, определяющем комплементарность антитела (CDR), обуславливает негативные последствия изомеризации Asp для связывающей способности омализумаба. Casia и соавт. [10] показали, что изоформа омализумаба, модифицированная лишь в одном из двух CDR-доменов, сохраняет только половину активности немодифицированного участка в методе, оценивающей связывающую способность  $F(ab')_2$  домена. Вариант, содержащий продукты изомеризации в обоих CDR-участках, сохраняет только 20% активности не деградировавшей молекулы. Таким образом, изомеризация последовательности Asp-Gly в CDR-1 омализумаба ассоциирована с потерей аффинности к антигену.

Наличие изоформ с изомеризованными остатками Asp может быть определено с помощью гидрофобной ВЭЖХ с предварительной обработкой белка папаином.

#### 1.4.2. Изоформы с различным зарядом

Одним из самых важных показателей гетерогенности терапевтических белков является состав изоформ с различными зарядами. Он может значительно влиять на *in vitro* и *in vivo* свойства моноклональных антител [78, 9, 17]. Потенциальная роль этих изоформ в стабильности белка, его активности, иммуногенности и фармакокинетических показателях продолжает изучаться [58]. Сообщается, что некоторые из антител насчитывают 5-7 изоформ с различными зарядами [123, 89]. Помимо ферментативных реакций, таких как сиалирование, отщепление С-концевого лизина, С-концевое амидирование и т.п., большинство изоформ появляется благодаря неферментативным реакциям, изменяющимся в зависимости от окружающих условий, таких как pH, температура, длительность экспозиции и т.п. [89]

Наибольший отрицательный эффект на качество целевого антитела могут оказывать кислые изоформы [58]. Например, исследования связывающей активности, выполненные с помощью поверхностного

плазмонного резонанса, выявили, что кислые изоформы потенциального биоаналога трастузумаба имели более слабое связывание с рецептором HER2 по сравнению с щелочными вариантами. *In vitro* исследования с использованием клеточной линии рака груди (BT-474) подтвердили меньшую связывающую способность кислых вариантов белка, ведущую к меньшей антипролиферативной активности [17].

Показано, что моноклональные антитела имеют широкий диапазон кислых изоформ, включая такие, для которых характерны ковалентные модификации белка, а также те, что связаны с химической деградацией специфических пептидных регионов антитела [58].

По данным разработчика оригинальной молекулы, основной вклад в состав кислых изоформ омализумаба вносит дезамидирование остатков аспарагина. Щелочные формы образуются за счёт С-концевого лизина, окисления метионина HC-431, промежуточных продуктов изомеризации Asp или остатков сигнального пептида Val-His-Ser- [51].

#### 1.4.3. С-концевые лизины

Для моноклональных антител характерна следующая терминальная последовательность тяжёлой цепи: -Pro-Gly-Lys, однако С-концевой лизин подвержен удалению щелочными карбоксипептидазами в кровяном русле или в культуре клеток млекопитающих [52]. На данный момент отсутствуют доказательства влияния С-концевого лизина на *in vitro* активность, а также на какую бы то ни было активность антител, поскольку С-конец ориентирован в противоположную от эпитопов Fc-рецепторов сторону [112].

Однако гетерогенность по С-концевому лизину оказывает эффект на общий заряд антитела, что делает возможным влияние терминального лизина на фармакокинетические параметры, особенно при подкожном введении, после которого материал должен мигрировать через катионное несосудистое пространство, чтобы достигнуть лимфатической системы. Данные предположения были опровергнуты Khawli и соавт. [72], в работе которых

показано, что при подкожном введении крысам фракций моноклональных антител, имеющих различный заряд, фармакокинетические параметры ( $C_{max}$ , AUC, период полувыведения) эквивалентны для всех фракций белка (основной пик, кислые и щелочные формы).

Кроме того, в спецификации на препарат «Ксолар» отсутствует метод контроля, позволяющий определять уровень С-концевых лизинов, что дополнительно свидетельствует о невысокой критичности данного параметра.

#### 1.4.4. Гликирование

Гликирование – формирования глюкозой и боковыми цепями остатков лизина основания Шиффа, претерпевающего дальнейшую перегруппировку Амадори с образованием стабильного кетоамина [37]. Высокая степень гликирования коррелирует с длительностью экспозиции белка и уровнем глюкозы в питательной среде во время культивирования продуцента.

Гликирование, по мнению оригинатора, не является критическим показателем качества омализумаба, поскольку в CDR-участках отсутствуют остатки лизина, а исследования активности гликированных и не гликированных форм показали сравнимую *in vitro* активность [51]. Что касается безопасности, то гликированные формы, скорее всего, не представляют опасность для пациентов, принимающих омализумаб, поскольку известно, что сывороточные антитела также подвержены гликированию [84].

#### 1.4.5. Неспаренные цистеины

Антитела IgG1 имеют 32 остатка цистеина, которые обычно формируют 16 дисульфидных связей [27].

Разработчики оригинальной молекулы омализумаба установили, что для данного антитела характерно наличие неспаренных цистеинов Cys22 и Cys96, которые формируют дисульфидную связь VH-петли [51]. Было

показано, что фракция антитела, имеющая неспаренные цистеины, обладает сниженной активностью в тесте ингибирования связывания IgE-рецептора.

#### 1.4.6. Fc-гликозилирование

Основные олигосахариды, представленные в омализумабе, – биантенные фукозилированные структуры сложного типа с одним, двумя или не содержащие галактозных остатков на не восстанавливаемом конце, а также ещё несколько минорных форм (рисунок 7).

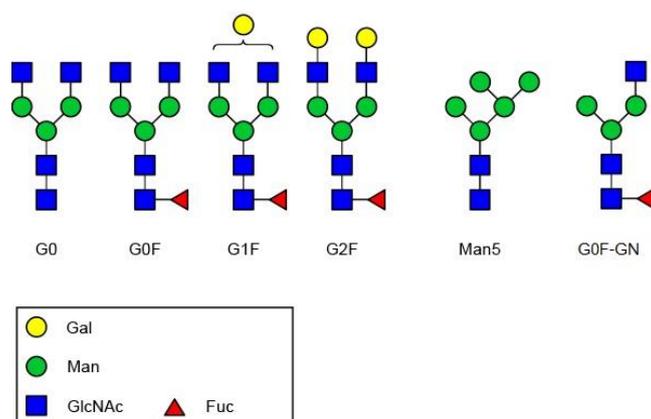


Рисунок 7 - Схематическое изображение основных гликанов, представленных в молекуле омализумаба (Gal – галактоза, Man – манноза, GlcNAc – N-ацетил-D-глюкозамин, Fuc – фукоза)

Широко изучено влияние различных типов гликанов на эффекторные функции антител, в основе действия которых лежит антителозависимая (ADCC) или комплементзависимая (CDC) цитотоксичности [39, 54, 35, 111]. Ниже приведена краткая сводка установленных на текущий момент зависимостей между типом гликана и его воздействием на эффекторную функцию антитела (Таблица 2).

Что касается зависимости фармакокинетики антител от Fc-гликозилирования, то здесь остаётся много неизвестных. Сывороточные IgG защищены от катаболизма FcRn-рецептором [70], а связывание с FcRn не зависит от типа Asp297-гликозилирования или занятости этого сайта [114]. Однако выведение из кровотока для многих гликопротеинов может быть

опосредовано также лектиновыми рецепторами, такими как асиалогликопротеины (связывают терминальную галактозу) и маннозные рецепторы (узнают терминальную маннозу и N-ацетил-D-глюкозамин).

Таблица 2 - Влияние вариантов Fc-гликозилирования на эффекторные функции антитела

Asn-297 гликан	CDC	ADCC
Не гликозилирован	Ухудшает	Ухудшает
Высокие галактозы (G2F, G1F)	Может улучшить	Нет эффекта
Олигоманнозы (Man5, Man6)	Ухудшает	Улучшает
Не фукозилирован (G0, Man5)	нет информации	Сильно улучшает
Двойной Glc-NAc (G0F, G0)	Может улучшить	Нет эффекта

Для того чтобы установить влияние Fc-гликановой гетерогенности омализумаба на скорость его выведения из кровотока, Harris и соавт. провели исследования на мышах, которым вводили через хвостовую вену 5 мг/кг препарата и брали пробы в 4 точках для оценки профиля гликанов циркулирующего антитела [51]. Финальная точка на 96 часов показала остаточную концентрацию омализумаба около 34% относительно стартовой точки (15 мин). В случае неоднородности выведения молекул омализумаба с различными гликанами разработчики смогли бы это оценить в ходе анализа остаточных количеств препарата. В результате эксперимента было установлено, что распределение олигосахаридов не изменилось в течение времени наблюдения (рисунок 8). Таким образом, в данной животной модели Fc-гликаны омализумаба не оказывали влияние на скорость выведения молекулы антитела. Последовавшие за этим исследования на людях подтвердили полученные результаты [61, 69, 96].

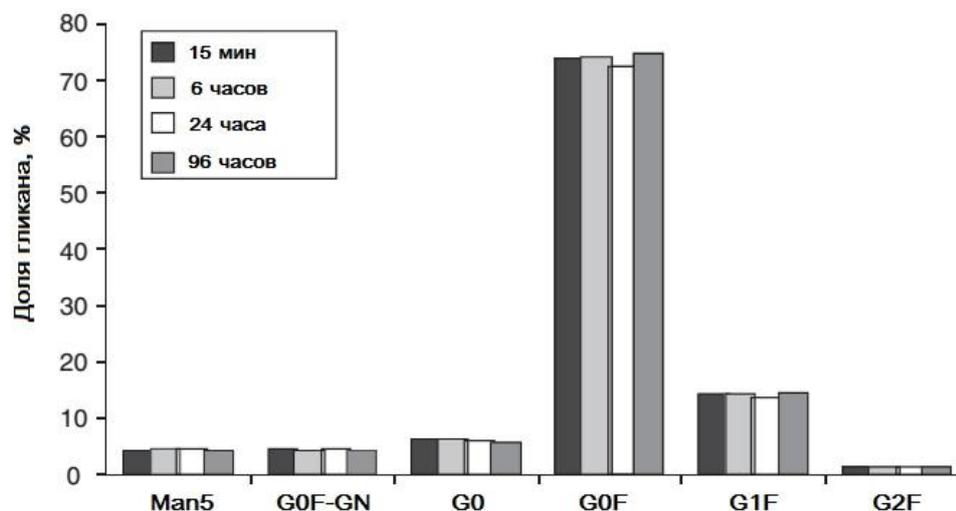


Рисунок 8 - Относительное распределение гликанов омализумаба через 15 мин, 4 часа, 24 часа и 96 часов после введения мышам в хвостовую вену

Также необходимо отметить, что в ходе анализа серий референтного препарата нами были отмечены существенные изменения профиля гликозилирования, что, вероятнее всего, связано с изменениями процесса производства препарата «Ксолар», упоминание о которых можно найти в ежегодном отчёте Европейского Медицинского Агентства [32]. После внесённых изменений препарат продолжал продаваться под торговой маркой «Ксолар», что говорит о сопоставимости клинических характеристик белка до и после изменения технологии.

#### Определение диапазона приемлемых значений критических показателей качества

Согласно подходу QbD, после определения перечня КПК необходимо установить диапазоны варьирования критических характеристик целевого продукта.

В случае разработки биоаналогов данная информация генерируется полностью на основе изученных свойств оригинального препарата. В ходе этой работы необходимо проанализировать серии оригинального препарата с

различным сроком годности, поскольку это позволяет понять вариабельность, присущую тому продукту, который необходимо воспроизвести. На основании глубокой физико-химической и биологической характеристики референтного препарата уточняют допустимые пределы КПК.

Одним из важнейших моментов, которые необходимо учитывать в ходе установления спецификаций разрабатываемых биоаналогов, является тот факт, что практически для всех референтных препаратов в ходе их жизненного цикла были характерны изменения процесса производства [91].

Производители вносят изменения в процесс производства БЛС по ряду причин, включая масштабирование процесса для удовлетворения возросшего спроса, увеличение эффективности процесса, модернизацию процесса путём замены или апгрейда основного оборудования. Концепция *сопоставимости* позволяет осуществлять изменения производства без необходимости регистрации нового продукта. Протоколы изучения сопоставимости, имеющие похожую структуру в разных странах, призваны показать, что различия между свойствами целевого продукта до и после внесения изменений в технологию производства являются минимальными.

Несмотря на то, что производители стремятся минимизировать изменения профиля качества своего продукта в результате проводимых модификаций производства, такие изменения не всегда можно избежать. Тем не менее, после рассмотрения регуляторными органами всех доказательств взаимозаменяемости двух препаратов, полученных до и после изменения технологии, производитель, как правило, получает право продавать БЛС под тем же торговым наименованием.

Этот факт позволяет разработчикам биоаналогов оперировать более широкими диапазонами свойств для разрабатываемых молекул, поскольку они уже прошли клиническую апробацию и признаны регуляторными органами допустимыми и не влияющими на безопасность и эффективность препарата.

Характерными примерами данных одобренных изменений являются выявленные Schiestl и соавт. вариации ключевых характеристик таких препаратов, как Аранесп (дарбэпоэтин альфа), Мабтера (ритуксимаб) и Энбрел (этанерцепт) [107]. В Sandoz были изучены лоты этих препаратов, реализуемые на рынке с 2007 по 2010 годы.

Активная фармацевтическая субстанция Аранеспа, дарбэпоэтин альфа – белок, стимулирующий эритропоэз. Представляет собой генно-инженерный аналог человеческого эритропоэтина. Он отличается от эндогенного эритропоэтина, главным образом, заменой аминокислотной последовательности путём введением двух дополнительных сайтов N-гликозилирования, эффектом чего является пролонгированный период полувыведения *in vivo*. Биологическая активность и клинический эффект эритропоэтинов зависят от профиля гликанов, который необходимо тщательно контролировать в ходе производственного процесса.

Schiestl и соавт. охарактеризовали коммерческие лоты, продаваемые на территории Европейского Союза, с помощью капиллярного зонного электрофореза, разделяющего изоформы с различным зарядом. Заряд молекулы дарбэпоэтина зависит от числа сиаловых кислот в ней (Рисунок 9). Известно, что биологическая активность *in vivo* зависит от числа сиаловых кислот в молекуле, будучи результатом доступности сайтов сиалирования, антенности N-гликанов и полноты сиалирования. Schiestl и соавт. обнаружили разницу в распределении изоформ между двумя выборками лотов препарата Аранесп. Лоты со сроком годности до апреля 2010 года показали более высокую степень сиалирования, чем лоты со сроком годности, заканчивающимся после сентября 2010 года. Среднее содержание более сиалированной изоформы №5 уменьшилось на 10%, в то время как менее сиалированные изоформы увеличились на 3% (изоформа №4) и на 5% (изоформа №3). Однако обе выборки лотов показали очень высокую воспроизводимость внутри самих выборок (Рисунок 9 а). Степень различия между выборками может свидетельствовать о том, что это изменение

является последствием модификации процесса производства. И действительно, в 2008 году Европейское Медицинское Агентство (ЕМА) одобрило существенное изменение процесса производства Аранеспа на основании расширенных анализов сопоставимости.

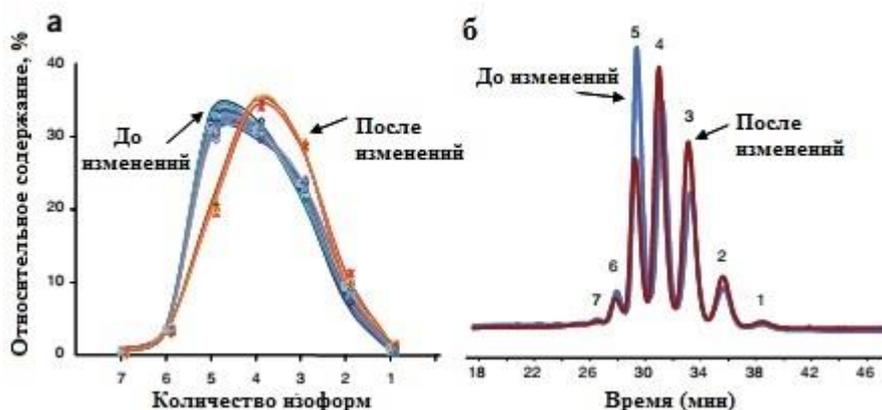


Рисунок 9 - Сравнение серий Аранеспа до и после изменения технологии, проведённое с помощью капиллярного зонного электрофореза. (а) Относительное содержание отдельных изоформ в сериях до изменения ( $n = 18$ ) и после изменения ( $n = 4$ ) технологии. (б) репрезентативны

Препарат Мабтера/Ритуксан в качестве активного ингредиента содержит химерное моноклональное антитело против В-клеточного поверхностного антигена CD20 (ритуксимаб). Главным образом используется при неходжкинских лимфомах и ревматоидном артрите. Основной вклад в терапевтическое действие и клиническую эффективность вносит Fc-опосредованная эффекторная функция, зависящая от гликозилирования.

Schiestl и соавт. проанализировали серии препарата Мабтера/Ритуксан со сроками годности, заканчивающимися в период с сентября 2007 года по октябрь 2011 года. В качестве основных методов анализа использовались картирование гликанов, катионообменная хроматография (СЕХ) и антителозависимая цитотоксичность (ADCC) (Рисунок 10). Для серий со сроком годности, оканчивающимся в 2010 году и позже, было отмечено резкое изменение профиля качества. Наиболее очевидная разница была

определена с помощью СЕХ и состояла в изменившемся количестве вариантов с С-терминальным лизином и N-терминальным глутамином (Рисунок 10 а, б). Эти варианты элюируются как щелочные изоформы после основного пика. Более поздние серии содержали гораздо меньшее количество этих изоформ, их уровень снизился с ~30-50% до ~10%. Стоит отметить, что гетерогенность по концевым лизину и глутамину довольно характерна для моноклональных антител и не играет существенной роли в биологических свойствах молекулы.

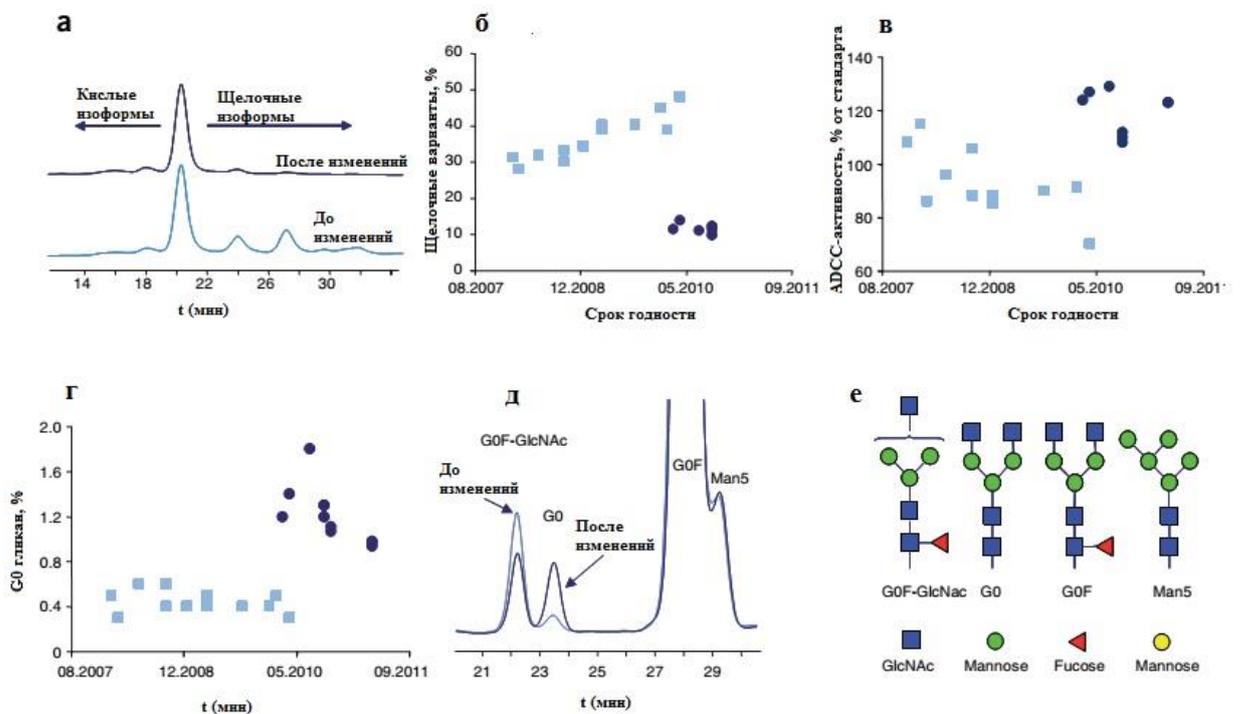


Рисунок 10 - Сравнение различных серий Ритуксана/Мабтеры, произведённых до и после изменений технологии. (а) Типичные катионообменные хроматограммы препарата Ритуксан/Мабтера. (б) Уровень щелочных изоформ, измеренный катионообменной хроматографией в сериях, полученных до ( $n = 12$ ) и после ( $n = 6$ ) внесения изменений в технологию производства. (в) ADCC-активность серий белка до ( $n = 11$ ) и после ( $n = 8$ ) внесения изменений. (г) Относительное содержание гликана G0 в сериях препарата, полученных до ( $n = 13$ ) и после ( $n = 11$ ) внесения изменений. (д) Типичные хроматограммы распределения гликанов. (е) Расшифровка гликанов

Ещё одно отличие было обнаружено в гликопрофиле Мабтеры и касалось дефукозилированного гликана G0 (Рисунок 10 г, д). Доля этого

гликана составляет всего ~1%, но он оказывает существенный эффект на ADCC-активность, которая во многом определяет механизм действия молекулы. Антитела, имеющие только дефукозилированные гликаны, проявляют намного более высокую ADCC-активность, чем антитела с фукозилированными гликанами [51]. Доля дефукозилированного гликана G0 выросла в препарате Мабтера примерно в 3 раза (Рисунок 10 г). ADCC-активность также увеличилась (Рисунок 10 в), но менее чем в 3 раза, демонстрируя, что, помимо G0, ADCC может зависеть также от других структурных элементов антитела.

Обнаруженные Schiestl и соавт. изменения профиля Мабтеры с большой вероятностью могут являться свидетельством модификаций процесса производства препарата.

Третий пример, Энбрел, в качестве активного компонента содержит димерный гибридный белок этанерцепт, связывающий фактор некроза опухоли альфа (ФНО-альфа). Этанерцепт состоит из внеклеточного домена ФНО-рецептора и Fc-фрагмента человеческого IgG1 антитела. Белок гликозилирован как в Fc-части (N-гликозилирование), так и в рецепторной части (O-гликозилирование). Schiestl и соавт. проанализировали коммерческие серии продукта, продаваемого в ЕС и США, с помощью картирования гликанов и катионообменной хроматографии. Результаты показали высокую воспроизводимость профиля качества препарата для серий со сроком годности, оканчивающимся в 2009 году. После этого периода на рынке появились серии с изменившимися характеристиками (Рисунок 11). Основные отличия были обнаружены в профиле гликозилирования этанерцепта. Доля вариантов, содержащих гликан G2F, снизилась с ~50% до ~30% (Рисунок 11 б, г). СЕХ-анализ продемонстрировал изменение количества щелочных изоформ, представленных, в основном, С-концевыми лизинами, с 15-30% до 40-60% (Рисунок 11 а, в).



Приведённые примеры показывают, что разработчики биоаналогов могут существенно расширить диапазон допустимых значений тех показателей качества, вариабельность которых была отмечена ими в оригинальных препаратах. В отсутствие подобной информации перед компаниями, разрабатывающими биоаналогичные молекулы, встают зачастую невыполнимые задачи по воспроизведению узкого профиля качества, характерного для оригинального препарата в данный период времени.

### 1.5. Клетки СНО – основной инструмент для производства моноклональных антител

Одобрение в 1986 году человеческого тканевого активатора плазминогена в качестве первого терапевтического белкового препарата ознаменовало начало эпохи использования культур клеток млекопитающих в качестве основной системы экспрессии при производстве биологических лекарственных средств. Несмотря на наличие ряда альтернативных экспрессионных систем, таких как микробные клетки, клетки насекомых, трансгенные животные и растения, клетки млекопитающих уже длительное время главными продуцентами для коммерческого производства терапевтических белков. Среди наиболее часто используемых линий клеток млекопитающих можно выделить клетки ВНК (клетки почки новорожденного сирийского хомячка), NS0 (клетки мышины миеломы), НЕК 293 (клетки эмбриональных почек человека) и Per.C6 (ретинобласты эмбриона человека). Однако около 70% всех получаемых сейчас рекомбинантных белков производятся с помощью клеток СНО (клетки яичника китайского хомячка) [66, 75].

Весьма широкое использование клеток СНО в производстве БЛС может быть объяснено следующими причинами:

- клетки СНО могут осуществлять эффективные посттрансляционные модификации, в частности, корректное гликозилирование экспрессируемых белков, полностью функциональное в человеческом организме;
- клетки СНО могут быть легко адаптированы к росту в бессывороточных средах в суспензионном состоянии, что крайне предпочтительно для крупномасштабного производства терапевтических белков в вертикальных биореакторах с мешалкой;
- в течение уже более двух десятилетий клетки СНО демонстрируют свою безопасность в качестве продуцентов рекомбинантных белков, что делает более простым получение разрешения на коммерческое производство в случае использования данных клеток. Клетки СНО полностью соответствуют принципам биологической безопасности, поскольку подавляющее большинство патогенных вирусов человека, включая вирусы иммунодефицита, полиомиелита, гриппа и герпеса, не способно в них размножаться [25, 127]. Ниже приведены некоторые препараты, производимые с помощью клеток СНО (Таблица 3).

Таблица 3 - Перечень наиболее значимых зарегистрированных БЛС, производимых с помощью клеток CHO

Препарат	Активное вещество	Показание	Производитель	Год одобрения
Вектибикс	Анти-EGFR мкат	Метастазирующий колоректальный рак	Amgen	2006
Миозим	$\alpha$ -глюкозидаза	Болезнь Помпе	Genzyme	2006
Альдуразим	ларонидаза	Мукополисахаридоз I	Genzyme	2006
Оренсия	Ig-CTLA4 фьюжн	Ревматоидный артрит	Bristol-Myers Squibb	2005
Наглазим	N-ацетил-галактозамин-4-сульфатаза	Мукополисахаридоз VI	BioMarin	2005
Луверис	Лютеинизирующий гормон	Бесплодность	Serono	2004
Авастин	Анти-VEGF мкат	Метастазирующий колоректальный рак и рак лёгких	Genentech	2004
Адвейт	Фактор VIII (инж.)	Гемофилия А	Baxter	2003
Ксолар	Анти-IgE мкат	Бронхиальная астма	Genentech	2003
Раптива	Анти-CD11a мкат	Хронический псориаз	Genentech	2003
Фабразим	Альфа-галактозидаза	Болезнь Фабри	Genzyme	2003
Ребиф	Интерферон-бета	Ремитирующий рассеянный склероз	Serono	2002
Хумира	Анти-TNF- $\alpha$ мкат	Ревматоидный артрит	Abbott	2002
Аранесп	Эритропоэтин (инж.)	Анемия	Amgen	2001
Кэмпас	Анти-CD52 мкат	Хронический лимфолейкоз	Genzyme, Bayer	2001
РеФакто	Фактор VIII	Гемофилия А	Wyeth	2000
Тенектеплаза	Тканевый активатор плазминогена (инж.)	Инфаркт миокарда	Genentech	2000
Герцептин	Анти-HER2 мкат	Метастазирующий рак молочной железы	Genentech	1998
Энбрел	TNF $\alpha$ -рецептор фьюжн	Ревматоидный артрит	Amgen, Wyeth	1998

Продолжение таблицы 3

Препарат	Активное вещество	Показание	Производитель	Год одобрения
Бенефикс	Фактор IX	Гемофилия В	Wyeth	1997
Гонал-ф	Фолликуло-стимулирующий гормон	Бесплодность	Serono	1997
Ритуксан	Анти-CD20 мкат	Неходжкинская лимфома	Genentech, Biogen Idec	1997
Авонекс	Интерферон-бета	Ремитирующий рассеянный склероз	Biogen Idec	1996
Церезим	$\beta$ -глюкоцереброзидаза	Болезнь Гоше	Genzyme	1994
Пульмозим	Дезоксирибонуклеаза I	Муковисцидоз	Genentech	1993
Эпоген	Эритропоэтин	Анемия	Amgen	1989
Актилизе	Тканевый активатор плазминогена	Острый инфаркт миокарда	Genentech	1987

За последние 20 лет произошло практически 100-кратное увеличение продуктивности процессов с использованием клеток CHO (со 100 мг/л до 10 г/л и более) [47]. Это вызвано, в первую очередь, достижениями в области разработки питательных сред и стратегий подпитки. Несмотря на это, продолжают развиваться направления, позволяющие обеспечить более высокую производительность процессов производства рекомбинантных белков. Одним из таких направлений является использование непрерывных процессов культивирования культур клеток млекопитающих.

### 1.6. Способы культивирования клеток млекопитающих

К основным способам культивирования клеток млекопитающих относятся периодический (батч), периодический с подпиткой (фед-батч) и непрерывный (перфузионный) процессы. Выбор между данными способами может быть продиктован несколькими факторами. Батч и фед-батч отличаются простотой, надёжностью и меньшими затратами времени на

разработку и валидацию процесса (по сравнению с непрерывными системами). С другой стороны, непрерывные процессы позволяют получать нестабильные продукты, поскольку время пребывания белков в биореакторе гораздо короче, чем в периодических процессах.

**Батч и фед-батч** – наиболее широко используемые в биофармацевтике процессы производства. В ходе периодического культивирования клетки и питательная среда загружаются в биореактор, а через определённый промежуток времени культуральная жидкость выгружается из биореактора. На рисунке (Рисунок 12) представлен график изменения объёма среды в аппарате в батч-процессе. Время окончания процесса зависит от кинетики накопления продукта и, в некоторых случаях, от стабильности продукта внутри реактора.



Рисунок 12 - Изменение объёма жидкости во времени в ходе батч-культивирования:  $t_0$  – время подготовки биореактора;  $t_k$  – время завершения процесса;  $V$  – объём среды в биореакторе

Одним из вариантов батч-культивирования является многоциклический процесс [140, с. 67], в ходе которого при выгрузке материала в реакторе оставляют часть культуральной жидкости, которая служит посевным материалом для следующего процесса (цикла), и только после этого добавляется питательная среда (Рисунок 13). Повторные циклы роста клеток в реакторе снижают потребность в мойке, стерилизации аппарата, а также в подготовке инокулята. Vaskey и соавт. [4] описали подобную систему для

получения моноклональных антител в биореакторе объёмом 1300 л, которая непрерывно работала в течение нескольких месяцев. Каждые 84 часа реактор разгружали, оставляя при этом 10 % культуры в качестве инокулята для следующего цикла.

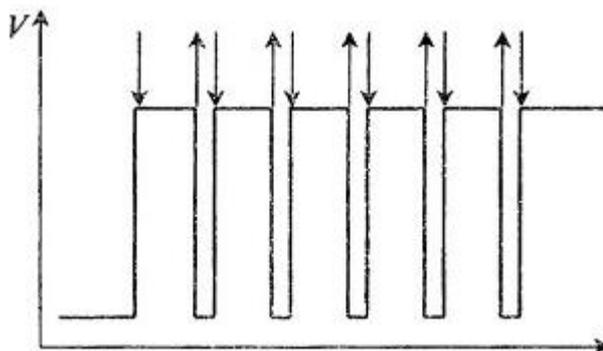


Рисунок 13 - Изменение объёма жидкости во времени при многоциклическом процессе культивирования. Стрелки вниз указывают загрузку свежей среды, а стрелки вверх – разгрузку биореактора

Наиболее востребованным вариантом батч-культивирования является фэд-батч процесс, в ходе которого небольшие объёмы питательных веществ подаются в биореактор для улучшения роста и продуктивности клеток (Рисунок 14). Стратегии подпитки обычно направлены на увеличение максимальной концентрации клеток и интегральной плотности жизнеспособных клеток (IVC). Современные добавки для клеточных культур были разработаны на основе глубокого понимания метаболизма клеток и их нутриентных потребностей. Они позволяют избежать истощения ключевых компонентов и чрезмерного накопления побочных продуктов метаболизма, таких как лактат и аммоний. Типичные подходы к оптимизации стратегий подпитки описаны Xie и Zhou [130]. Прогресс в технологиях фэд-батч культивирования является, возможно, самым важным фактором 100-кратного увеличения продуктивности процессов получения рекомбинантных белков с середины 1980-х годов [130]. Этот прогресс был, в основном, обусловлен потребностью отрасли производить очень большие количества терапевтических моноклональных антител.

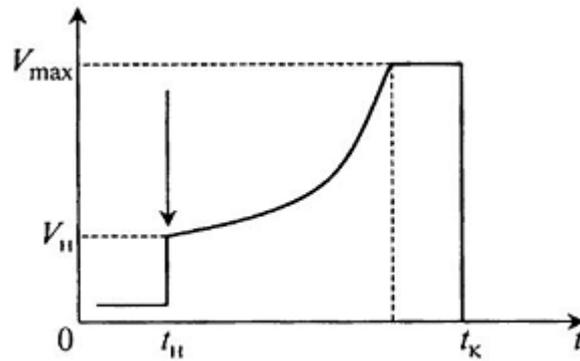


Рисунок 14 - Изменение объёма жидкости во времени при культивировании в режиме фед-батч. Стрелка указывает начало подпитки

В **непрерывных процессах** загрузка и выгрузка среды протекают непрерывно и одновременно, причём скорость подачи в аппарат свежей питательной среды равна скорости отбора из аппарата культуральной жидкости. В итоге объём среды в аппарате сохраняется постоянным в течение длительного времени (Рисунок 15), теоретически – бесконечно, а практически – до какой-нибудь неполадки [140]. Более подробное описание непрерывных процессов культивирования приведено в следующем параграфе.



Рисунок 15 - Зависимость объёма жидкости от времени при непрерывном культивировании

### 1.7. Перфузионные процессы культивирования клеток млекопитающих

Несмотря на бурное развитие, биофармацевтическая отрасль остаётся достаточно консервативной в отношении внедрения новых технологий

производства [126]. Поскольку изначально БЛС были уникальны и защищались патентами, используемые компаниями технологии фокусировались, в основном, на концепции скорейшего выхода на рынок, нежели чем на эффективности и стоимости процесса производства [43]. Поэтому, несмотря на то, что непрерывные процессы могли обеспечить более высокую производительность, наибольшее развитие получили сравнительно простые и надёжные процессы периодического культивирования – батч и фэд-батч. Более 90% всех биофармацевтических продуктов на данный момент производится с помощью периодических процессов [11]. Традиционно, непрерывные процессы культивирования использовались для производства нестабильных продуктов, таких как ферменты и факторы свёртывания крови – с целью минимизации времени пребывания этих белков в условиях биореактора и снижения их деградации.

Однако современные условия биофармацевтического рынка значительно отличаются от ситуации 10-20-летней давности. В разработке находятся сотни различных препаратов, условия рынка непрерывно меняются, возрастает конкуренция со стороны производителей биоаналогов – всё это становится серьёзным вызовом для консервативной отрасли [126, 43]. Поэтому в последние годы интерес отрасли к перфузионным процессам непрерывно растёт. Одновременно с этим увеличивается интерес к интеграции непрерывного культивирования с непрерывной хроматографией.

### ***1.7.1. Основы перфузионного культивирования***

Принципиальная схема осуществления перфузионного процесса представлена на ниже (Рисунок 16). В ходе перфузионного культивирования в биореактор с суспензией клеток непрерывно поступает свежая питательная среда со скоростью, заданной оператором. С той же скоростью из биореактора отбирается отработанная культуральная жидкость, не содержащая (или практически не содержащая) клеток. Отделение клеток

происходит с помощью специальных устройств различной конструкции, две из которых будут описаны в следующей главе. В то же время для предотвращения лимитов и стабилизации культуры клеток с помощью отдельного насоса может производиться частичный отбор суспензии, так называемый *блидинг*. Блидинг может составлять от 5 до 40% от общего потока отработанной культуральной жидкости.

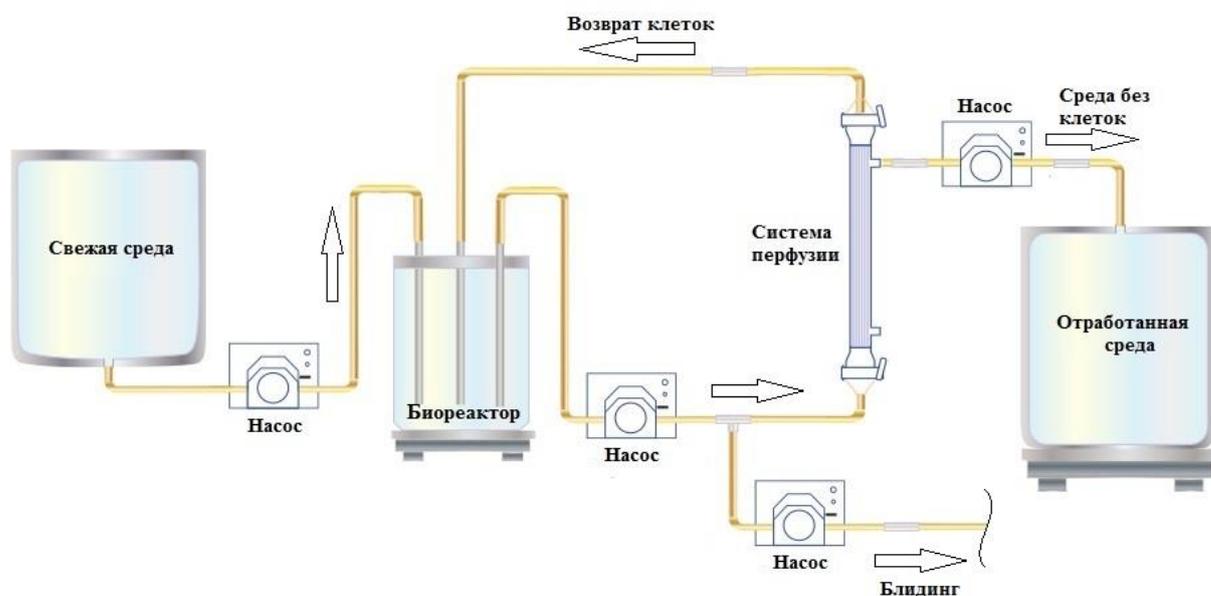


Рисунок 16 - Схема осуществления перфузионного процесса культивирования

В ходе перфузионного культивирования с помощью стандартных датчиков осуществляется мониторинг основных параметров процесса, таких как уровень растворённого кислорода, pH, температура, скорость перемешивания и т.д. Кроме того, перфузионный реактор должен быть оснащён весовой системой для поддержания постоянного объёма суспензии в биореакторе и предотвращения его переполнения или опустошения. С помощью специального программного обеспечения осуществляется управление ключевыми параметрами процесса, определёнными на этапе разработки.

### ***1.7.2. Устройства для отделения клеток в ходе перфузионного культивирования***

Ключевым компонентом любой перфузионной системы является устройство для отделения клеток [128, 12, 121]. Необходимость в таком устройстве отсутствует лишь в исключительных случаях, когда (1) в биореакторе с фиксированным слоем используются иммобилизованные на микроносителях клетки, либо (2) суспензия клеток ограничена мембраной, через которую протекает среда (например, реактор с полыми волокнами). Однако применимость данных систем вследствие их не масштабируемости невелика и ограничена производством моноклональных антител для диагностических целей [120].

Сепарационный принцип большинства традиционных систем основан на размере клеток и на разнице плотности клеток и водного раствора, в котором они находятся. Однако, поскольку клетки животных относительно малы (10-20 мкм в диаметре), а их плотность (1,06-1,14 г/см<sup>3</sup>) [92] близка к плотности водного раствора питательной среды, отделение клеток от культуральной жидкости представляет собой нетривиальную задачу. Кроме того, отсутствие клеточной стенки делает клетки чрезвычайно чувствительными к механическим воздействиям, что также накладывает ограничения на механизмы сепарации. Вдобавок, довольно часто наблюдается тенденция к налипанию клеток на поверхности сепарирующих устройств, что приводит к нарушению их работы.

Сепарирующие устройства, используемые при перфузионном культивировании клеток млекопитающих, опираются на три разных механизма разделения:

- осаждение (под действием гравитационной или центробежной силы);
- агрегация клеток под действием ультразвуковых волн (с дальнейшим осаждением);

- фильтрация (тангенциальная фильтрация, переменная тангенциальная фильтрация, спин-фильтр, вращающийся цилиндрический или дисковый фильтр, фильтрация на плоской мембране в волновом биореакторе).

Сепарирующие устройства могут быть расположены как внутри биореактора, так и во внешней рециркуляционной петле (Рисунок 17). Преимущество внутреннего расположения устройства – в удобстве для оператора, поскольку нет необходимости в дополнительных трубках, соединениях, насосах и т.д. Однако при выходе такой системы из строя (например, при забивке пор фильтрующей поверхности) прекращается весь процесс культивирования, в то время как в случае внешнего расположения сепаратора есть возможность замены его на запасное устройство, заранее приготовленное оператором.

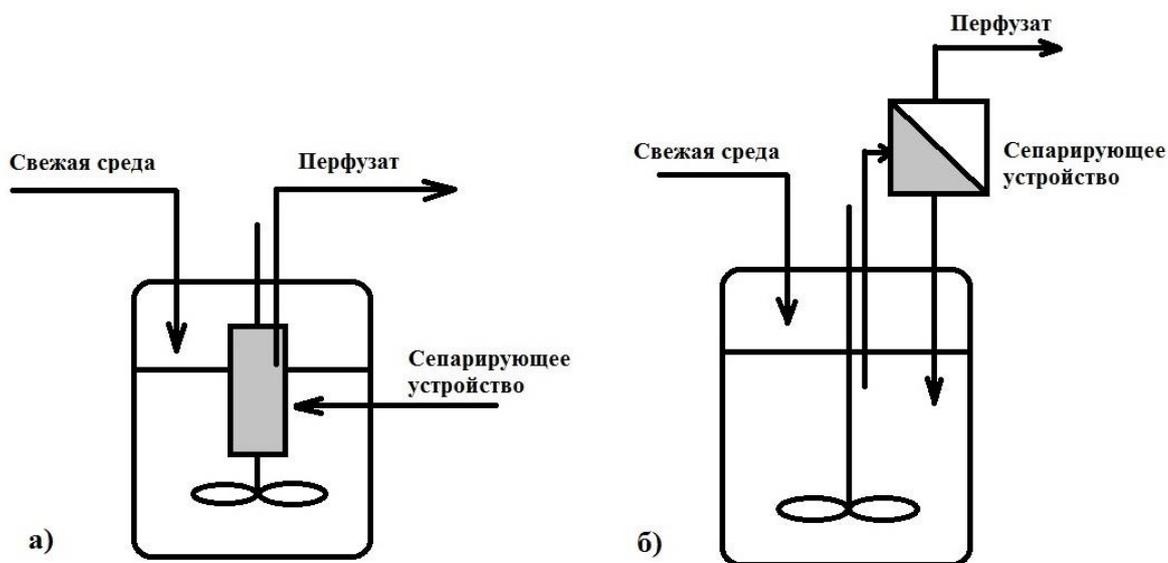


Рисунок 17 - Локализация сепарирующего устройства в перфузионной системе: а) внутри биореактора, б) снаружи биореактора

Далее описаны две перфузионные системы, используемые в представленном диссертационном исследовании.

### ***1.7.3. Волновой биореактор с интегрированной мембраной для отделения клеток***

Одним из типов биореакторов со встроенной системой перфузии является волновой биореактор Flexsafe RM (ранее Cultibag RM) производства компании Sartorius Stedim (Германия). В волновом биореакторе суспензия приводится в движение качающимися движениями платформы, на которой закреплён биореактор. Полиэфирсульфоновая мембрана зафиксирована на нижней стенке биореактора с внутренней стороны (Рисунок 18) и в течение всего процесса культивирования омывается движущимся потоком суспензии. Между стенкой биореактора и мембраной имеется полость, в которую попадает отфильтрованная культуральная жидкость. Движущую силу фильтрации создаёт перистальтический насос, с помощью которого по трубке отбирается фильтрат и создаётся разрежение в полости. При эффективном омывании мембраны культуральной жидкостью процесс перфузии может поддерживаться в течение как минимум 1-2 месяцев без блокирования пор мембраны клеточным дебрисом и гелевым слоем белка. При этом концентрация клеток в данном типе биореакторов может достигать до 100-150 млн/мл благодаря высоким значениям  $K_{La}$ , достигающим  $24,1 \text{ ч}^{-1}$  [29].

Благодаря простоте эксплуатации и высокой надёжности использование данного типа биореакторов в лаборатории является предпочтительным перед другими типами реакторов с перфузионными системами. Однако ограничения в масштабируемости не позволяют использовать волновые реакторы с встроенными перфузионными системами в крупнотоннажных производствах.



Рисунок 18 - Конструкция одноразового волнового биореактора Sartorius Flexsafe (Cultibag) RM в перфузионном исполнении: 1 – встроенная мембрана для отделения клеток, 2 – набор портов и трубок, имеющих различное назначение (отбор проб, подача среды и титранта для регулировки pH, отбор осветлённой культуральной жидкости, порты для световодов)

#### ***1.7.4. Система переменной тангенциальной фильтрации ATF System (Repligen, США)***

Система переменной тангенциальной фильтрации использует традиционные волоконные модули, помещённые в специальный металлический (в пилотных и промышленных версиях) или в одноразовый пластиковый корпус (для исследовательских лабораторий). Ниже приведена принципиальная схема работы системы ATF (Рисунок 19). Суспензия клеток протекает через просвет волокон, при этом направление движения циклически меняется для лучшей очистки поверхности мембраны [110]. Верхняя часть ATF напрямую присоединена к биореактору через трубку большого диаметра (для снижения сдвиговых нагрузок на клетки). В нижней части ATF находится диафрагма, периодически совершающая движения вверх и вниз за счёт подведённых линий сжатого воздуха и вакуума. Каждый цикл занимает примерно 10-20 секунд. Движения диафрагмы заставляют клеточную суспензию вытекать из биореактора, а затем возвращаться в него.

Отфильтрованная через поры полых волокон культуральная жидкость с заданной скоростью отбирается из системы и поступает в сборник перфузата.

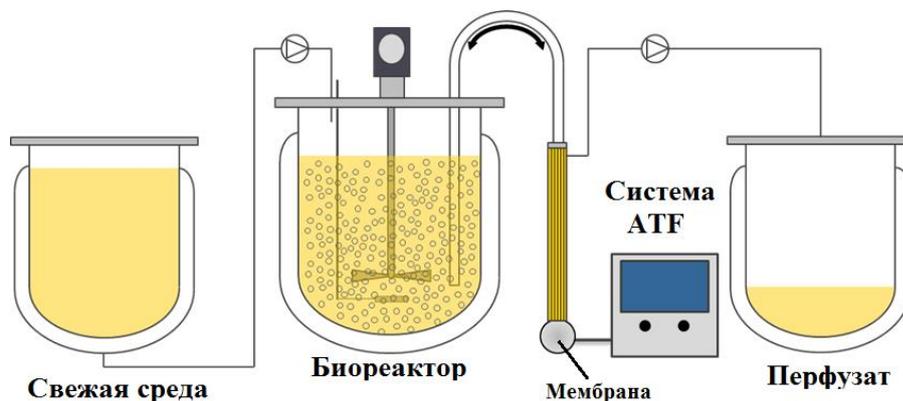


Рисунок 19 - Принципиальная схема осуществления перфузии с помощью системы ATF

Система ATF способна поддерживать процессы с очень высокой концентрацией клеток (100-200 млн/мл), что делает её наиболее востребованной среди биофармацевтических компаний [110]. Также существенным преимуществом данного устройства является его линейная масштабируемость, что является слабым местом большинства сепарирующих устройств.

В нескольких известных исследованиях систему ATF сравнивали с другими устройствами, такими как акустические сепараторы, спин-фильтры, проточные центрифуги, клеточные осадители. Во всех этих исследованиях ATF показывала себя более эффективной системой.

В работе Duvar и соавт. [26] описано достижение в биореакторе концентрации клеток 68 млн./мл и 130 млн./мл при использовании ATF системы, оснащённой полволоконными мембранами с размером пор 0,2 мкм и 50 кДа, соответственно. В случае мембраны 50 кДа продукт задерживался внутри биореактора, превращая процесс в так называемую «концентрированную перфузию», при этом выход белка был в 4 раза выше, чем при фэд-батч культивировании. Четыре других протестированных

сепарирующих устройства позволяли получить максимальную концентрацию клеток, в 4-6,5 раз меньшую, чем система ATF.

Crowley и соавт. [16] сравнили между собой ATF, спин-фильтр и акустический сепаратор на модели клеток PER.C6, экспрессирующих моноклональные антитела. Максимальная концентрация клеток оказалась в 3-5 раз выше при использовании системы ATF, что привело к волюметрической продуктивности 0,9 г/л/сут. В случае спин-фильтра продуктивность составила 0,1-0,2 г/л/сут, акустического сепаратора – 0,6 г/л/сут.

Однако в исследовании Clincke и соавт. [14, 15] было показано, что в сравнении с другой системой половолоконной фильтрации – TFF – система ATF может демонстрировать более низкую эффективность. Причиной этого послужила высокая вязкость суспензии клеток, что отразилось на производительности ATF-диафрагмы. Максимальная концентрация клеток, достигнутая с помощью ATF, составила 136 млн./мл, с помощью TFF – 214 млн./мл.

#### ***1.7.5. Преимущества и недостатки перфузионного культивирования***

Перфузионные процессы культивирования обладают рядом преимуществ перед традиционными периодическими процессами. Основное преимущество – существенно бóльшая производительность перфузионных процессов, превышающая производительность периодических процессов в 4-10 раз [86]. Эта разница обусловлена высокими концентрациями клеток, достигаемыми в перфузионных реакторах за счёт частичного или полного отделения биомассы продуцента от выходящего потока культуральной жидкости и возвращения её в биореактор. Кроме того, для перфузионных процессов характерны благоприятные и стабильные условия роста клеток благодаря непрерывному отводу продуктов метаболизма и внесению свежих

питательных веществ. За счёт малого времени пребывания продукта в биореакторе и низкого содержания протеаз в культуральной жидкости обеспечивается высокое качество целевого белка. Это особенно важно для высоколабильных, склонных к деградации гликопротеинов, таких как ферменты и факторы свёртываемости крови [46].

Ещё одним преимуществом перфузии является возможность гораздо более полной автоматизации культивирования. В результате автоматизации снижается влияние человеческого фактора на технологические процессы, улучшается их воспроизводимость и надёжность.

Полная совместимость перфузии с одноразовыми технологиями позволяет создать процесс, в котором будут использоваться только одноразовые материалы, что существенно снижает риски производства. Также одноразовость позволяет снизить капитальные затраты при создании новых производств [11, 65]. За счёт более высокой производительности процесса культивирования снижаются потребности в производственных площадях и многотоннажных биореакторах. Небольшие объёмы реакторов, непрерывность работы и низкие капитальные затраты обуславливают высокую гибкость перфузионных процессов.

С помощью перфузионных процессов можно создавать высокоплотные рабочие банки или сокращать количество этапов разгона культуры перед продукционным биореактором [14].

К недостаткам перфузионных процессов можно отнести большой расход питательных сред и длительный срок разработки и валидации технологии. Кроме того, существуют опасения относительно регуляторных затруднений при регистрации непрерывного производства, поскольку такой опыт у отечественных регуляторных органов практически отсутствует.

### ***1.7.6. Подходы к разработке перфузионных процессов***

Из-за большой длительности и технологической сложности перфузионного культивирования его разработка также является продолжительной задачей с высокими материальными и трудовыми затратами. Развитие технологий и роботизация исследований постепенно снижают затраты на разработку непрерывных процессов, однако, по сравнению с хорошо отработанной техникой оптимизации периодического культивирования, создание перфузионных технологий остаётся комплексной задачей с нестандартной методологией.

#### **1.7.6.1. Оптимизация питательной среды**

Одной из ключевых задач при разработке высокоплотных перфузионных процессов является оптимизация состава питательной среды. Несколькими авторами предложена стратегия использования специализированной питательной среды, в которой отдельные компоненты находятся в более концентрированном виде, чем в не модифицированной коммерчески доступной среде. С помощью такой среды удаётся поддерживать высокие клеточные плотности при более низких скоростях протока. Yang и соавт. [133] назвал этот подход «перфузия с контролируемой подпиткой» и сообщил о двукратном увеличении волюметрической производительности по сравнению с обычной перфузией, и почти десятикратном увеличении по сравнению с фэд-батч процессом. Feng и соавт. [34] развили эту стратегию и предложили аминокислотную подпитку, контролируемую с помощью удельной скорости потребления кислорода. Ими также отмечено двукратное повышение производительности процесса по сравнению с перфузией без подпитки.

Поскольку основным преимуществом периодических процессов всегда являлась высокая концентрация целевого продукта в культуральной

жидкости, при разработке перфузионного культивирования много внимания уделяется снижению удельных скоростей перфузии (УСП) для увеличения содержания белка в КЖ. Такой подход получил название “push-to-low” [80], т.е. снижение УСП до максимально возможного уровня, при котором клетки остаются в стабильном состоянии. Такой подход, однако, применим лишь к стабильным белкам, которые не требуется максимально быстро выводить из биореактора.

Концепция УСП, впервые введённая Ozturk [103], была использована Dowd и соавт. [22] для оптимизации протока среды. Они оценивали различные УСП в диапазоне от 50 пл/кл./сут до 400 пл/кл./сут и наблюдали максимальную концентрацию продукта при 200 пл/кл./сут, в то время как волюметрическая производительность была наибольшей при 300 пл/кл./сут. В работе Warikoo и соавт. [125] сообщается о стабильной 60-дневной перфузии, которая после начала блидинга поддерживалась в стационарном состоянии при концентрации 50-60 млн/мл и УСП 40-50 пл/кл./сут.

Поддерживая удельную скорость перфузии на уровне 50-60 пл/кл./сут, Clincke и соавт. [14, 15] смогла достичь концентраций клеток в диапазоне 137-224 млн/мл. Для более экономной утилизации компонентов питательной среды авторы организовали отдельную подачу глюкозы и глутамина.

Как утверждает один из основоположников современного подхода к разработке перфузионных процессов Константинов [80], следующим этапом в оптимизации питательных сред должно стать достижение УСП порядка 10-15 пл/кл./сут.

#### 1.7.6.2. Создание двухфазного процесса

В качестве ещё одного способа повышения продуктивности высокоплотных перфузионных культур многие исследователи рассматривают разделение ростовой и продукционной стадий процесса и создание двухфазного культивирования, где в первой фазе основное внимание будет уделено росту клеток, а во второй фазе будет происходить подавление роста в пользу экспрессии продукта. Altamirano и соавт. [2] в

качестве способа замедления роста клеток предложили заменить глюкозу в питательной среде на медленно метаболизируемый сахар галактозу. Другой подход был использован Ibarra и соавт. [62]. С помощью индуктора они экспрессировали в клетках NS0 ингибитор циклин-зависимой киназы p21 (CIP1) для ареста клеточного цикла в G1-фазе и наблюдали 4-кратное увеличение продуктивности клеток.

Ещё одним способом перевода культуры клеток в продукционную фазу в перфузионном процессе является использование умеренной гипотермии (30-34°C). В последние 10-15 лет в области культивирования клеток млекопитающих наблюдается устойчивый тренд в использовании пониженных температур для снижения скорости роста клеток и за счёт этого увеличения продолжительности процесса культивирования [6]. Chupra и соавт. [13] одними из первых стали проводить эксперименты с гипотермическими условиями применительно к перфузионным культурам для снижения потребности клеток в кислороде, замедления метаболизма глюкозы/лактата и деградации продукта, упрощения контроля pH. До того момента не проводились эксперименты с пониженной температурой в непрерывном культивировании, но именно фактор температуры, по мнению авторов, должен был стать очень важным для перфузионных культур, поскольку позволял бы достичь более высоких клеточных плотностей и, соответственно, больших выходов белка при фиксированных скоростях потребления кислорода и протока среды. И, действительно, снижение температуры культивирования с 37°C до 34°C вызвало почти двукратное падение удельной скорости потребления глюкозы и 25%-ное снижение удельной скорости потребления кислорода. Это, в свою очередь, привело к повышению равновесной концентрации клеток на 23% при поддержании постоянной подачи кислорода в реактор за счёт скорости блидинга. Перфузионный процесс длительностью 7 месяцев, проведённый при 34°C, продемонстрировал стабильность течения с высокой жизнеспособностью и продуктивностью.

В ранней работе Churra и соавт. [13] умеренная гипотермия применялась с самого начала процесса, однако, в более поздних публикациях обычно выбиралась двухфазная стратегия, с начальной температурой культивирования 37°C и последующим её снижением. В работе Ahn и соавт. [1] описывается двухфазный перфузионный процесс культивирования клеток СНО, экспрессирующих эритропоэтин. В данном процессе температура культивирования снижалась с 37°C до значений 25-32°C после достижения концентрации клеток 10 млн./мл. Специфическая продуктивность клеток была максимальной при 30°C, но наибольший тотальный выход целевого белка наблюдался при 32°C. Причиной этого явилось значительное снижение скорости роста клеток при температурах ниже 32°C. Профили гликозилирования эритропоэтина при 32°C и при 37°C были сравнимы, однако дальнейшее снижение температуры культивирования негативно сказывалось на данном критическом показателе качества. Таким образом, авторы заключили, что температура 32°C является оптимальной для продукционной фазы процесса культивирования.

В случае производства фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) предварительные эксперименты в батч-режиме показали 13-кратное увеличение специфической продуктивности клеток при 28°C. На основании этих данных Юн и соавт. (ссылка) проводили перфузионный процесс со снижением температуры в продукционной фазе до 28°C после достижения клетками концентрации 36 млн./мл. Однако, несмотря на первоначальное резкое увеличение содержания ФСГ в культуральной жидкости, концентрация клеток, их жизнеспособность и выход белка вскоре начали падать. Это обусловлено, скорее всего, слишком сильным снижением активности клеточных ферментов по отношению к скорости роста клеток. Эта гипотеза была частично подтверждена тем, что при возвращении температуры культивирования к отметке 37°C показатели роста и жизнеспособности клеток были восстановлены.

Воздействие гипотермии на некоторые свойства продукта, такие как агрегация и гликозилирование, было изучено Rodriguez с соавт. [106] при перфузионном культивировании клеток СНО, экспрессирующих  $\beta$ -интерферон. Культивирование в режиме батч начиналось при 37°C, через 3 дня температура снижалась до 32°C, а проток среды включали лишь на восьмые сутки. При этом было установлено, что количество агрегатов в выделенном белке снижалось с 42,9% на 3 сутки до 28,7% на 8 сутки, а затем до 5,4% на 16 сутки (последний день процесса). Специфическая продуктивность увеличивалась на 60% с 3 по 8 сутки, а затем ещё на 117% с 8 по 16 сутки.

Добавление к питательной среде солей короткоцепочечных жирных кислот, таких как бутират и валерат натрия, является ещё одной стратегией снижения скорости роста и увеличения продуктивности [83, 79]. Hong и соавт. [56] отмечают, что при добавлении 1 мМ бутирата натрия к культуре СНО, растущей в колбах Эрленмейера в режиме псевдо-перфузии, наблюдается снижение скорости роста клеток при увеличении их выживаемости и специфической продуктивности. Kim и соавт. [76] исследовали поведение культуры клеток, растущей в биореакторе в перфузионном режиме, при добавлении 5 мМ бутирата натрия на 16 сутки культивирования. Несмотря на то, что относительно высокая концентрация бутирата привела к резкому снижению скорости роста и жизнеспособности, авторами были отмечены значительные улучшения в выходе белка и специфической продуктивности клеток.

Некоторые авторы комбинировали два фактора, влияющие на рост и продуктивность. В работе Vergara и соавт. [119] описан температурно/нутриентный шифт в полунепрерывной культуре клеток СНО, экспрессирующих тканевый активатор плазминогена (tPA). Снизив температуру с 37°C до 34°C и заменив глюкозу на галактозу, авторы добились увеличения специфической продуктивности на 112%.

Ещё один способ снизить скорость роста клеток и увеличить их специфическую продуктивность за счёт изменения состава питательной среды описан в работе [36]. Авторы установили, что снижение содержания аспарагина в питательной среде, подающейся в перфузионный биореактор, до 5 мМ приводит к подавлению пролиферации клеток СНО и увеличивает их общую продуктивность на 15-25%.

#### 1.7.6.3. Стабилизация культуры клеток в стационарной фазе

Одна из основных задач в ходе разработки перфузионного культивирования – получение истинно непрерывного процесса со стабильными характеристиками как роста, продуктивности клеток, так и качества целевого белка. Необходимо установить правильный баланс между экономическими характеристиками процесса и его стабильностью, поскольку зачастую условия, способствующие наиболее высокой продуктивности, не обеспечивают должной устойчивости процесса культивирования [90].

Важным инструментом достижения стабильного состояния продуцента является регулярный (дискретный или непрерывный) отбор некоторой части клеток из биореактора для предотвращения перерастания культуры, так называемый *блидинг*, в английской терминологии – *cell bleed* или *bleeding*. Большинство исследователей сходятся во мнении, что вывод клеток из биореактора с помощью блидинга – необходимое условие установления *равновесного состояния* (в английской терминологии – *steady state*) в ходе непрерывного культивирования [5, 19, 53, 93, 116]. Скорость блидинга является одним из параметров оптимизации, поскольку при избыточном выводе клеток из биореактора их пиковая плотность и, соответственно, производительность процесса могут быть неудовлетворительными, а слишком малая скорость блидинга может спровоцировать дестабилизацию культуры и привести к существенным изменениям качественных характеристик целевого белка в ходе перфузионного культивирования [42, 98].

Hiller и соавт. [53] изучали поведение культуры мышинной гибридомы в перфузионном культивировании при трёх различных скоростях перфузии (0,6, 1,0 и 2,0 сут<sup>-1</sup>) и трёх различных соотношениях *скорость перфузии/скорость блидинга* (1,0, 0,55 и 0,1). Было показано значительное увеличение пиковой концентрации клеток и волюметрической продуктивности при наибольшей скорости перфузии (2,0 сут<sup>-1</sup>) и низких соотношениях перфузия/блидинг (0,3 и 0,1). Однако увеличение волюметрической продуктивности при наименьшем отношении перфузия/блидинг происходило на фоне драматического падения жизнеспособности, последствием чего являются как технологические проблемы (сложности с осветлением КЖ), так и ухудшение качества целевого белка. Стоит отметить, что во всех экспериментах специфическая продуктивность клеток не зависела от их скорости роста

В работе Dalm и соавт. [18] приведено ещё одно исследование эффективности перфузионного процесса культивирования клеток мышинной гибридомы при различных скоростях перфузии и блидинга. Авторы обнаружили, что значения скоростей перфузии и блидинга могут быть разделены на два региона. В первый регион попадают низкие скорости перфузии (в данной работе это – 0,5 и 1,0 сут<sup>-1</sup>) и низкие скорости блидинга (0,05 и 0,1 сут<sup>-1</sup>). В этом регионе культура клеток оказывается лимитирована по ключевым нутриентам. При увеличении скоростей перфузии и блидинга (второй регион) культура перестаёт быть лимитирована, а пиковая плотность клеток зависит только от скорости блидинга и практически не зависит от скорости перфузии. Независимость концентрации клеток от скорости перфузии авторы объясняют некими внутриклеточными, не идентифицированными факторами. Авторы также утверждают, что в случае, если низкая жизнеспособность клеток не является критическим фактором для эффективности процесса культивирования, необходимо максимально снижать скорость блидинга. В противном случае требуется подбирать скорость блидинга, исходя из желаемой жизнеспособности.

Таким образом, правильный подбор скорости отбора суспензии клеток позволяет получать высокие клеточную плотность и выход белка без потери стабильности самого процесса.

#### 1.7.6.4. Проблемы масштабирования перфузионных процессов

Основные сложности, возникающие при масштабировании перфузионных процессов, схожи со сложностями для периодических процессов, однако, за счёт экстремальных клеточных плотностей негативные эффекты масштабирования перфузии проявляются острее.

Ключевыми при масштабировании высокоплотных перфузионных процессов являются следующие задачи [132]:

- ✓ обеспечение в пилотных и промышленных биореакторах гидродинамических и массообменных характеристик, сравнимых с лабораторными биореакторами;
- ✓ эффективный отвод растворённого углекислого газа, накапливающегося в культуральной жидкости;
- ✓ минимизация негативного влияния газовых пузырьков на клетки продуцента.

Кроме того, при использовании устройств для отделения клеток на основе фильтрующих мембран, к которым относится система ATF, нередко возникают следующие проблемы:

- ✓ механическая забивка мембраны с полной остановкой фильтрации;
- ✓ образование гелевого слоя, препятствующего прохождению целевого белка, с частичным сохранением фильтрующей способности мембраны.

Одной из самых серьёзных проблем при масштабировании процессов культивирования животных клеток является избыточное накопление в культуральной жидкости углекислого газа. При этом необходимо отметить,

что растворённый углекислый газ является одним из важнейших компонентов систем культивирования клеток млекопитающих. Он необходим как для роста и развития клеток, так и для поддержания уровня рН в питательных средах, где применяется бикарбонатный буфер [64, 77, 138, 45, 82]. Неоптимальные концентрации углекислого газа в среде создают существенную проблему при культивировании клеточных культур, включающих клетки яичника китайского хомячка (СНО). Нормальная физиологическая концентрация  $\text{CO}_2$  для используемых в фармацевтической промышленности клеток млекопитающих составляет 4-8%, что соответствует парциальному давлению углекислого газа ( $\text{pCO}_2$ ) 30-55 мм рт. ст. Отклонения от данного диапазона могут ингибировать рост культуры вплоть до его полной остановки, снижать жизнеспособность и продуктивность клеток [64, 77, 138, 45]. Механизм ингибирования роста клеток избытком  $\text{CO}_2$  связан с беспрепятственным прониканием его неполярных молекул в цитоплазму и митохондрии с последующим критическим снижением внутриклеточного рН, что нарушает работу ионных каналов  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  и  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  и ингибирует важнейшие ферментативные реакции [82, 38, 101]. Изменение рН внутри ЭПС и аппарата Гольджи влияет на процессы сборки и секреции белков, изменяя их свойства [115, 100].

Проблема избытка  $\text{CO}_2$  обычно возникает в вертикальных биореакторах с мешалкой, имеющих рабочий объем 100 л и более, где для интенсификации массопереноса кислорода используют микропористые барботёры с диаметром пузырей менее 0,1 мм. Малый размер пузырей снижает расход кислорода, однако, при этом затрудняется транспорт углекислого газа из среды, так как скорость удаления  $\text{CO}_2$  через поверхность жидкости намного ниже скорости массопереноса  $\text{O}_2$  из пузырьков в раствор. Чем больше реактор, тем меньше отношение поверхности жидкости к объему, меньше пузырьков достигает поверхности и хуже удаляется  $\text{CO}_2$  [45]. Углекислый газ накапливается, угнетая культуру. Например, в реакторе объемом 1000 л повышение  $\text{pCO}_2$  от 68 до 179 мм рт. ст. уменьшало продуктивность клеток

СНО на 40% [97], а в другом 500-литровом реакторе увеличение  $p\text{CO}_2$  до 105 мм рт. ст. в несколько раз снижало клеточную плотность [45].

Бурное развитие непрерывных технологий культивирования клеток млекопитающих привело к появлению проблемы избыточного накопления  $p\text{CO}_2$  и в реакторах гораздо меньшего масштаба (с рабочим объёмом 10-50 л) за счёт сверхвысоких клеточных концентраций, нередко достигающих 100-200 млн. кл/мл.

Как правило, избыток  $\text{CO}_2$  удаляют из реакторов объёмом больше 5 л с помощью крупных пузырей воздуха диаметром 2-3 мм, иногда для этой цели используют барботаж и в лабораторных реакторах, где среда легко насыщается кислородом посредством поверхностной аэрации [45, 50]. Некоторые исследователи отключали подачу  $\text{CO}_2$  при культивировании клеток в колбах. На стадии экспоненциального роста это приводит к преждевременной остановке развития культуры, но на продукционной фазе такой прием способен вдвое увеличить выход целевого белка за счет остановки клеточного цикла в фазе G1 [100, 134]. Добавление определенных аминокислот может нивелировать отрицательное действие  $\text{CO}_2$  на клетки, повышая буферность цитоплазмы и нормализуя нарушенный транспорт ионов через мембрану, что значительно повышает удельную скорость роста клеток и их продуктивность [28, 73, 74, 20]. Очевидно, что неправильно выбранная газовая стратегия может иметь критические последствия для роста и развития культуры клеток как в условиях исследовательской лаборатории, так и в крупнотоннажном производстве.

## 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материалы и методы

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 11А8, полученная в МБЦ «Генериум» на основе линии СНО-К1 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.** Разморозка ампул криобанка 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 мМ L-глутамин (Applichem, Германия) при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 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<sub>2</sub> в культуральной жидкости в течение процесса культивирования в приемлемом диапазоне.

Контроль pH осуществляли с помощью регулируемой подачи CO<sub>2</sub> или 5 %-ного раствора гидроксида натрия.

**Хемостат.** Культивирование клеток в режиме хемостат 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 фэд-батч культивировании. рН-статирование осуществляли в течение всего процесса с помощью подачи  $\text{CO}_2$  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. рН-статирование осуществляли в течение всего процесса культивирования с помощью подачи  $\text{CO}_2$  или 5 %-ного раствора гидроксида натрия. Частота качания платформы с биореактором находилась в диапазоне 22-28 кач/мин. Угол наклона платформы составлял  $6^\circ$ . Температура культивирования в фазе роста –  $37^\circ\text{C}$ . 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 вёлся 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 полволоконный фильтр с размером пор 0,2 мкм.

**Глубинная фильтрация.** Осветление культуральной жидкости, содержащей клетки и клеточный дебрис, проводили с использованием глубинных фильтров ZetaPlus (3M, США) с двухслойным материалом 60SP02A. Скорость фильтрации устанавливали в диапазоне  $0,1-0,5 \text{ мл/см}^2/\text{мин}$ . 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 Cpto 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 Cpto 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 м<sup>2</sup>, 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 довели 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 объем 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.

### Аналитические методы

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  $pO_2$ ,  $pCO_2$ , концентрации глутамина, глутамата, ионов аммония, калия и натрия проводили с помощью биохимического анализатора Bioprofile 400 (NOVA Biomedical, США).

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 помощью хроматографии гидрофильных взаимодействий в системе ВЭЖХ Alliance e2695 (Waters, США) с детектором Multi  $\lambda$  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  $7,5 \times 75$  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  $4,6 \times 300$  мм (Phenomenex) с предколонкой Security Guard Cartridge, GFC 2000, размером  $4 \times 3,0$  мм (Phenomenex).

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

## 2.2. 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 БЛС. При этом целевой профиль в дальнейшем служит базисом для разработки технологии производства фармацевтической субстанции и лекарственного препарата. В случае разработки биоаналога целевой профиль качества жёстко привязан к характеристикам оригинального препарата.

Разработке технологии производства биоаналога омализумаба в МБЦ «Генериум» предшествовало определение целевого профиля качества продукта и критических показателей качества фармацевтической субстанции целевого белка. Поскольку в данной работе основная часть исследований посвящена разработке процесса культивирования, мы остановимся на тех показателях качества, основное влияние на которые оказывает именно процесс культивирования клеток продуцента. Как уже указывалось ранее, показатели качества, зависящие от условий культивирования, включают в себя:

- Fc-гликозилирование белка;
- распределение изоформ с различным зарядом;
- С-концевые лизины;
- изомеризация остатков Asp;
- и др.

### 2.2.1. Определение целевого профиля продукта

Ключевые аспекты целевого профиля продукта, важные для оценки критичности показателей качества фармсубстанции омализумаба, приведены ниже.

**Эффективность препарата.** Активным действующим веществом препарата «Ксолар» является омализумаб, гуманизированное моноклональное антитело IgG1. *Механизм действия* омализумаба основан на селективном связывании и нейтрализации молекулы-мишени (иммуноглобулина E). Омализумаб образует комплекс со свободным IgE в плазме человека, предотвращая его связывание с высокоаффинными (FcεRI) рецепторами на поверхности тучных клеток, базофилов и антигенпрезентирующих клеток. Таким образом, ингибируется развитие иммунного ответа и аллергической реакции у больных со среднетяжёлой или тяжёлой формой атопической бронхиальной астмы [68].

Используемые *дозы препарата* – 150-375 мг «Ксолара» подкожно каждые две или четыре недели, в зависимости от веса пациента и базового уровня тотального IgE в крови, измеренного перед началом терапии.

**Безопасность препарата.** При применении «Ксолара» могут возникать местные или системные аллергические реакции, включая анафилактический шок. Наиболее распространены реакции в месте введения препарата – боль, отёк, зуд и эритема. Также часто (более 1 случая на 100 человек) отмечаются головные боли [141].

### 2.2.2. Определение критичности показателей качества

Первый этап определения критических показателей качества заключался в составлении расширенного перечня показателей качества фармацевтической субстанции омализумаба. Все показатели качества

субстанции моноклонального антитела могут быть разделены на 4 категории [30]:

- примеси, связанные с продуктом;
- примеси, связанные с процессом производства;
- контаминанты;
- другие примеси.

К основным показателям качества моноклональных антител относятся: количество агрегатов, профиль гликозилирования (количество сиаловых кислот, остатков фукозы, галактозы, высокоманнозных гликанов), дезамидирование остатков аспарагина, изомеризация остатков аспарагиновой кислоты, окисление остатков метионина, гликирование, С-концевые лизины, гетерогенность изоформ с различным зарядом, количество остаточных белков и ДНК клеток-продуцентов, эндотоксины и т.д.

На втором этапе определения критических показателей качества 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. Инструмент оценки рисков был взят из A-Mab Case Study [3]. Подход, используемый при ранжировании рисков, включает в себя разделение риска на несколько компонентов, требующихся для оценки соответствующих факторов риска (например, потенциальное воздействие на безопасность и эффективность и неопределённость относительно информации, используемой для оценки потенциального воздействия). Две величины (воздействие и неопределённость) перемножаются, чтобы определить уровень риска, который характеризует общую критичность показателя качества. Ниже приведены возможные уровни воздействия и неопределённости (Таблица 4, Таблица 5).

Таблица 4 - Определение уровня воздействия при ранжировании рисков

Уровень воздействия	Биологическая активность или эффективность	ФК/ФД	Иммуногенность	Безопасность
Очень высокий (20)	Очень значительное изменение	Значительное изменение ФК	АЛА детектируются и ограничивают безопасность	Необратимые НЯ
Высокий (16)	Значительное изменение	Умеренное изменение с влиянием на ФД	АЛА детектируются и ограничивают эффективность	Обратимые НЯ
Умеренный (12)	Умеренное изменение	Умеренное изменение без влияния на ФД	АЛА детектируются и имеют управляемый <i>in vivo</i> эффект	Управляемые НЯ
Низкий (4)	Допустимое изменение	Допустимое изменение без влияния на ФД	АЛА детектируются и имеют минимальный <i>in vivo</i> эффект	Незначительные, преходящие НЯ
Отсутствует (0)	Нет изменений	Нет влияния на ФК и ФД	АЛА не детектируются или детектируются без значимого <i>in vivo</i> эффекта	Нет НЯ

ФК – фармакокинетика, ФД – фармакодинамика, АЛА – антилекарственные антитела, НЯ – нежелательные явления

Таблица 5 - Определение уровня неопределённости при ранжировании рисков

Уровень неопределённости	Описание имеющейся информации по данной модификации целевой молекулы
7 (Очень высокий)	Нет информации (новая модификация белка)
5 (Высокий)	Опубликованная внешняя информация для подобной модификации в схожей молекуле
3 (Умеренный)	Доклинические или <i>in vitro</i> данные по этой молекуле или данные (доклинические, <i>in vitro</i> или клинические), полученные на подобном классе молекул
2 (Низкий)	Данная модификация была представлена в препарате, прошедшем клинические исследования
1 (Очень низкий)	Было установлено влияние данной модификации на этой молекуле в клинических исследованиях

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

Нами была проведена оценка критичности тех показателей качества, которые, согласно нашему опыту и литературным данным, зависят от процесса культивирования продуцента (см. раздел 3.4).

Итоги оценки критичности параметров качества омализумаба представлены ниже (Таблица 6).

Таблица 6 - Уровень критичности показателей качества омализумаба, зависящих от процесса культивирования

	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.

### 2.2.3. Приемлемые диапазоны параметров качества

На основании проведённой оценки критичности параметров качества омализумаба, а также результатов анализа 4 серий оригинального препарата

и нормативов, установленных производителем в спецификации на «Ксолар», были определены допустимые диапазоны для каждого из параметров (Таблица 7). Для наиболее критичных параметров (изомеризация, кислые изоформы и неспаренные цистеины) допустимый диапазон был установлен аналогичным диапазоном варьирования внутри серий оригинального препарата. Для менее критичных показателей диапазон был расширен в соответствии со степенью критичности.

Таблица 7 - Установленные до начала разработки процесса культивирования приемлемые диапазоны показателей качества потенциального биоаналога омализумаба

Наименование показателя	Диапазон значений показателей качества омализумаба, %		
	в 4 сериях оригинального препарата	в спецификации оригинального препарата	установленный для первичной разработки
Изомеризация Asp	3,0±1,0	не более 10	3,0±1,0
Изоформы с различным зарядом, кислый пик	10,4±0,3	не установлен	10,4±0,3
Неспаренные цистеины	26,0±1,0	не более 31	26,0±1,0
С-концевые лизины, сумма щелочных пиков	13,5±1,0	не установлен	17,5±7,5
Fc-гликозилирование. Олигосахариды без фукозы, (G0-N+G0+Man5+Man6+G1)	11,6-15,2	не установлен	5-20
Fc-гликозилирование. Олигосахариды с галактозой, (G1+G1F+G2+G2F+A1F)	8,6-32,5	не установлен	5-40
Fc-гликозилирование. Маннозосодержащие олигосахариды, (Man5+ Man6)	6,3-8,9	не установлен	2-10
Гликирование	не анализировали	не установлен	не установлен

### 2.3. Определение критических параметров процесса получения культуральной жидкости с целевым белком

Как правило, лабораторная технология получения культуральной жидкости с целевым белком, основанная на перфузионном культивировании, состоит из следующих основных этапов:

Этап 1. Получение посевной культуры клеток в колбах Эрленмейера

Этап 2. Культивирование продуцента в производственном биореакторе

Этап 2.1. Накопление биомассы («разгон культуры»)

Этап 2.2. Получение производственных сливок

Этап 3. Осветление суспензии клеток, отбираемой из биореактора, с помощью глубинной фильтрации

Начальная оценка рисков технологии получения культуральной жидкости с целевым белком была проведена с использованием имеющегося опыта разработки непрерывных и периодических процессов культивирования. Эта оценка показала, что культивирование продуцента в производственном биореакторе является единственным этапом, имеющим значительный риск для качества продукта (Таблица 8).

Таблица 8 - Начальная оценка рисков, связанных с процессом перфузионного культивирования

Этап процесса		Риск воздействия на параметры качества продукта	Риск воздействия на ключевые показатели процесса
1	Получение посевной культуры в колбах Эрленмейера	низкий	<b>высокий</b>
2	Производственный реактор – разгон культуры	<b>высокий</b>	<b>высокий</b>
3	Производственный реактор – получение производственных сливок	<b>высокий</b>	<b>высокий</b>
4	Осветление суспензии клеток глубинной фильтрацией	низкий	средний

Этап получения посевной культуры в колбах Эрленмейера изучался в ходе предыдущих разработок, которые показали низкий уровень влияния данной процедуры на эффективность перфузионного культивирования при соблюдении стандартных схем посева культуры. Получение посевной культуры носит платформенный характер и не требует дополнительного изучения или оптимизации. Влияние этапа получения посевной культуры на качество продукта пренебрежимо мало в силу практического отсутствия целевого белка, экспрессированного в ходе накопления посевной культуры, в продукционных сливах.

Осветление суспензии клеток, отводимой из биореактора, не оказывает значительного влияния на эффективность получения культуральной жидкости с целевым белком при осуществлении этой операции в рамках стандартного подхода – непрерывная глубинная фильтрация отводимой суспензии клеток с периодической заменой глубинного фильтра. Применяемые глубинные фильтры не сорбируют целевое антитело и сертифицированы для применения в биотехнологических производствах.

Ниже (Таблица 9) приведена сводная информация о влиянии различных параметров процесса культивирования на ростовые и продукционные характеристики культуры клеток и качество целевого белка (жирным шрифтом выделены параметры с высокой степенью риска). Данная информация получена в ходе предыдущих разработок как непрерывных, так и периодических процессов. В рамках разработки перфузионного культивирования продуцента омализумаба приведённые зависимости использовались для получения стабильного, высокопродуктивного процесса, в ходе которого экспрессируется белок требуемого качества.

Таблица 9 - Сводная информация о влиянии параметров процесса на его эффективность и качество целевого белка

Параметр	Имеющаяся информация
Начальная плотность клеток	<p>Влияет на скорость достижения пиковой плотности клеток, не влияет на пиковую плотность клеток, специфическую продуктивность, удельную скорость роста и скорость потребления глюкозы.</p> <p><b>Воздействие на качество белка/уровень риска:</b> не влияет на качество целевого белка и рассматривается как параметр с малой степенью риска</p>
Температура	<p>Влияет на пиковую плотность клеток, удельную скорость роста, продолжительность процесса культивирования, специфическую продуктивность и скорость потребления глюкозы. Температурный шифт 37°C/32°C показал универсальный характер и приемлемые ростовые/продукционные характеристики для используемой клеточной линии.</p> <p><b>Воздействие на качество белка/уровень риска:</b> температура может оказывать умеренное влияние на гликозилирование белка (степень галактозилирования) и рассматривается как параметр со средней степенью риска</p>
pH	<p>Влияет на удельную скорость роста, специфическую скорость потребления глюкозы и продукции лактата.</p> <p><b>Воздействие на качество белка/уровень риска:</b> pH оказывает влияние на изоформы с различным зарядом и рассматривается как параметр с <i>высокой</i> степенью риска</p>
Уровень растворённого кислорода	<p>Не оказывает влияния на качество продукта и динамику процесса культивирования в широком диапазоне значений (30-80%) Необходимо поддерживать выше концентрации 30% во избежание негативного влияния на эффективность процесса.</p> <p><b>Воздействие на качество белка/уровень риска:</b> может влиять на качество продукта при недостаточном уровне контроля за процессом культивирования, рассматривается как параметр со средней степенью риска.</p>

Продолжение таблицы 9

Параметр	Имеющаяся информация
Уровень растворённого CO <sub>2</sub>	<p>Не оказывает влияния на качество продукта и динамику процесса в определённых диапазонах значений в зависимости от фазы развития клеток. Приемлемый диапазон является процесс- и клон-специфичным.</p> <p><b>Воздействие на качество белка/уровень риска:</b> при определённых условиях может влиять на качество продукта, рассматривается как параметр со средней степенью риска.</p>
Продолжительность процесса	<p>В случае стабилизированного процесса культивирования не влияет на пиковую плотность клеток, специфическую скорость потребления глюкозы и образования лактата. Может влиять на продуктивность в случае нестабильной клеточной линии.</p> <p><b>Воздействие на качество белка/уровень риска:</b> 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.</p>
Скорость протока среды (скорость перфузии)	<p>Влияет на пиковую плотность клеток. Может влиять на специфическую продуктивность, скорость потребления глюкозы и образования лактата.</p> <p><b>Воздействие на качество белка/уровень риска:</b> 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.</p>
Скорость блидинга	<p>Влияет на пиковую плотность и удельную скорость роста клеток, продуктивность, специфическую скорость потребления глюкозы и образования лактата, продолжительность процесса.</p> <p><b>Воздействие на качество белка/уровень риска:</b> может значительно влиять на качество продукта, рассматривается как параметр с <i>высокой</i> степенью риска.</p>
Ускорение перфузии	<p>В ходе предварительных экспериментов было установлено, что данный параметр может влиять на стабилизацию процесса культивирования.</p> <p><b>Воздействие на качество белка/уровень риска:</b> влияние на качество белка не изучено, поэтому рассматривается как параметр с <i>высокой</i> степенью риска.</p>

Отправной точкой оптимизации критических параметров процесса, влияющих на качество целевого белка, служит реализация и анализ базового процесса культивирования. Основные технологические параметры, используемые для базового процесса, приведены ниже (Таблица 10). Данные параметры были неоднократно апробированы в различных перфузионных процессах, проведённых на базе МБЦ «Генериум», и демонстрировали приемлемые результаты по стабильности и продуктивности культивирования других продуцентов, полученных на базе той же исходной клеточной линии, что и продуцент биоаналога омализумаба.

Таблица 10 - Основные параметры базового процесса культивирования в перфузионном режиме

Параметр процесса	Значение параметра	Способ контроля параметра
Начальная клеточная плотность, млн/мл	0,5±0,05	Счётчик клеток
Температура культивирования, °С	37 – фаза накопления биомассы, 34 – 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
Скорость перфузии, 1/сут	1,0	то же

#### 2.4. Выбор состава питательной среды

Одним из необходимых шагов реализации базового процесса культивирования является обоснование состава питательной среды – фактора, во многом определяющего эффективность перфузионного

культивирования. Правильно выбранные базовая питательная среда и добавки к ней позволяют добиваться как высокой продуктивности процесса, так и обеспечивать высокое качество экспрессируемого белка, что особенно актуально при разработке биоаналогичных ЛС.

На основании опыта, полученного в ходе выполнения предыдущих проектов, связанных с технологией производства моноклональных антител, в качестве базовой была выбрана питательная среда BalanCD CHO Growth A. Она зарекомендовала себя как высокоэффективная и стабильная базовая среда, демонстрирующая минимальную вариабельность между партиями, имеющая высокую стабильность при хранении даже в жидком виде, поддерживающая высокую скорость роста культуры клеток. BalanCD CHO Growth A показала свою эффективность для периодических процессов культивирования, в результате чего она была выбрана в качестве платформенной среды для последующих разработок. Обоснование состава питательной среды сводилось к скринингу добавок, отобранных из ряда коммерчески доступных композиций, и определению оптимального соотношения среда:добавка.

В ходе обоснования состава питательной среды проводились эксперименты в колбах Эрленмейера, а также в биореакторах Biostat B Twin. В первом случае культивирование осуществлялось в режиме фэд-батч (периодическое с подпиткой), 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. Ниже приведены кривые роста продуцента CHO 11A8 при культивировании на базовой среде BalanCD CHO Growth A с использованием различных добавок производства Irvine Scientific и HyClone (Рисунок 20), а также данные по содержанию

целевого белка в культуральной жидкости экспериментальных процессов (Рисунок 21).

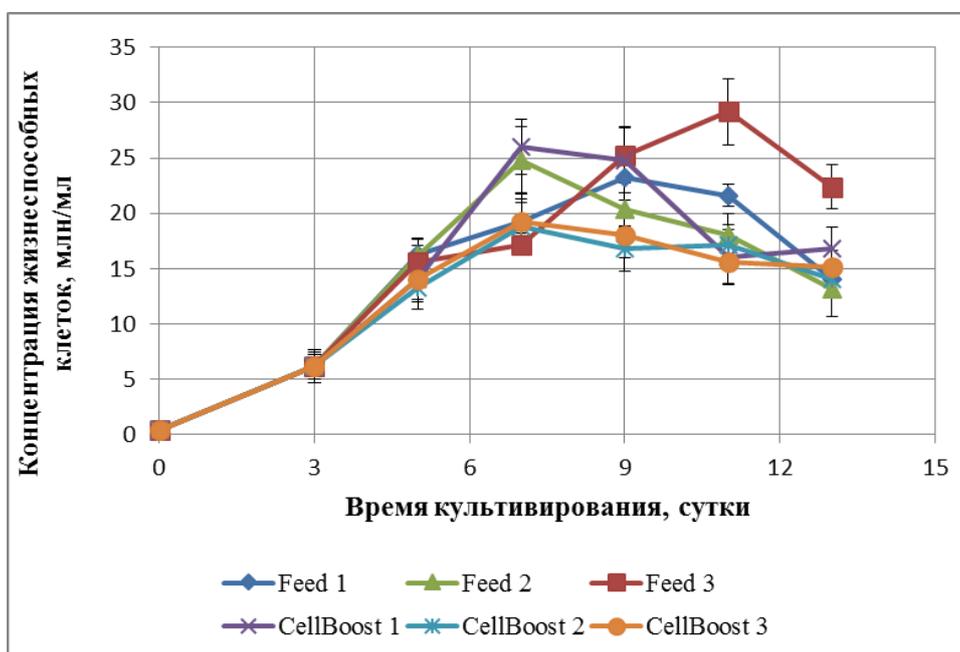


Рисунок 20 - Кривые роста клеток линии CHO 11A8 в ходе скрининга добавок к питательной среде. Культивирование проводилось в режиме фэд-батч (количество независимых экспериментов  $n = 3$ , предел погрешностей обозначает размах)

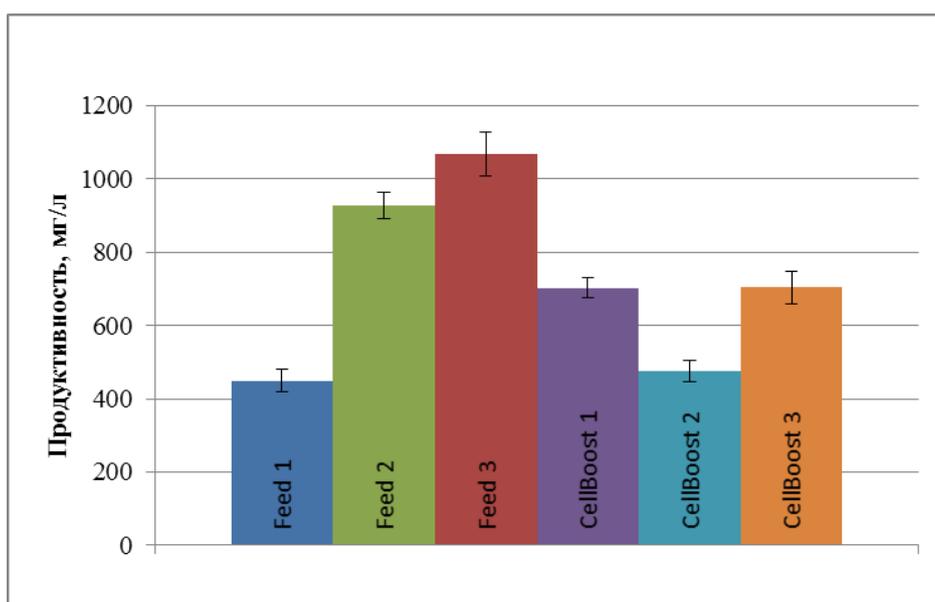


Рисунок 21 - Продуктивность клеток линии CHO 11A8 при культивировании в режиме фэд-батч на среде BalanCD CHO Growth A с использованием различных добавок ( $n = 3$ , предел погрешностей обозначает размах)

Для определения оптимальной концентрации добавки Feed 3 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% (Таблица 11).

Таблица 11 - Зависимость пиковой концентрации клеток продуцента и выхода целевого белка от концентрации добавки Feed 3 в базовой питательной среде. Культивирование проводилось в режиме хемостат ( $n = 2$ )

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

## 2.5. Оптимизация режима ускорения протока питательной среды

На следующем этапе разработки базового процесса необходимо было отработать начальную стадию культивирования, поскольку наши предварительные эксперименты показывали, что особое внимание в ходе разработки перфузионного процесса должно быть уделено именно этапу накопления биомассы. Этот этап, по нашим наблюдениям, играет существенную роль в определении физиологического состояния культуры клеток при переходе в стационарную фазу. Оптимальные параметры протока питательной среды в логарифмической фазе культивирования предотвращают нутриентное лимитирование культуры и обеспечивают плавность перехода клеток в стационарную фазу. Неверно выбранная стратегия во время активного роста клеток может привести к снижению экономической эффективности процесса.

Несмотря на значительное количество исследований, посвящённых разработке перфузионных процессов культивирования клеток СНО, практически отсутствуют работы, описывающие влияние режима протока питательной среды на начальном этапе перфузии на поведение клеток в стационарной фазе.

В представленном исследовании максимальная скорость перфузии была ограничена базовым значением  $1,0 \text{ сут}^{-1}$ . Увеличение скорости протока питательной среды до верхнего предела вели с тремя разными ускорениями:  $0,25 \text{ сут}^{-2}$  (процесс №1),  $0,15 \text{ сут}^{-2}$  (процесс №2) и  $0,1 \text{ сут}^{-2}$  (процесс №3). Графически изменения скорости перфузии в ходе экспериментальных процессов представлены ниже (Рисунок 22).

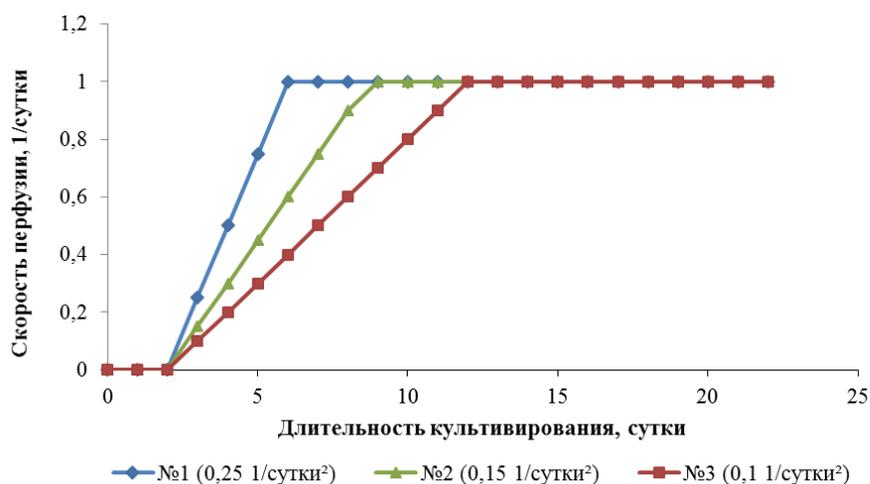


Рисунок 22 - Графики изменения скорости протока среды при различных ускорениях перфузии

В процессе №1 наблюдалась наибольшая скорость роста клеток с достижением пика концентрации на седьмые сутки (Рисунок 23 А). Затем была отмечена резкая остановка пролиферации, за которой последовало частичное вымывание клеток за счёт непрерывного отбора суспензии (блидинга). Одновременно снизилась жизнеспособность культуры (до 82%, Рисунок 23 Б). Причиной такого поведения, как правило, является лимитирование по одному из компонентов питательной среды, вероятнее всего, незаменимой аминокислоте. Необходимо подчеркнуть, что блидинг, начавшийся за сутки до достижения максимальной скорости протока среды, оказался неэффективным и не предотвратил лимитирование роста культуры. Таким образом, стимулирование метаболизма растущих клеток при избыточном ускорении перфузии привело к истощению ключевых компонентов питательной среды и негативным последствиям для пролиферации и выживаемости клеток.

Стоит отметить, что за счёт вымывания клеток и быстрого снятия нутриентных ограничений отмирание культуры в процессе №1 оказалось обратимым, и через 9 суток нормальный рост и продуктивность клеток (Рисунок 23 Г) восстановились. Однако период восстановления, на наш

взгляд, является слишком длительным и снижает общую эффективность процесса культивирования.

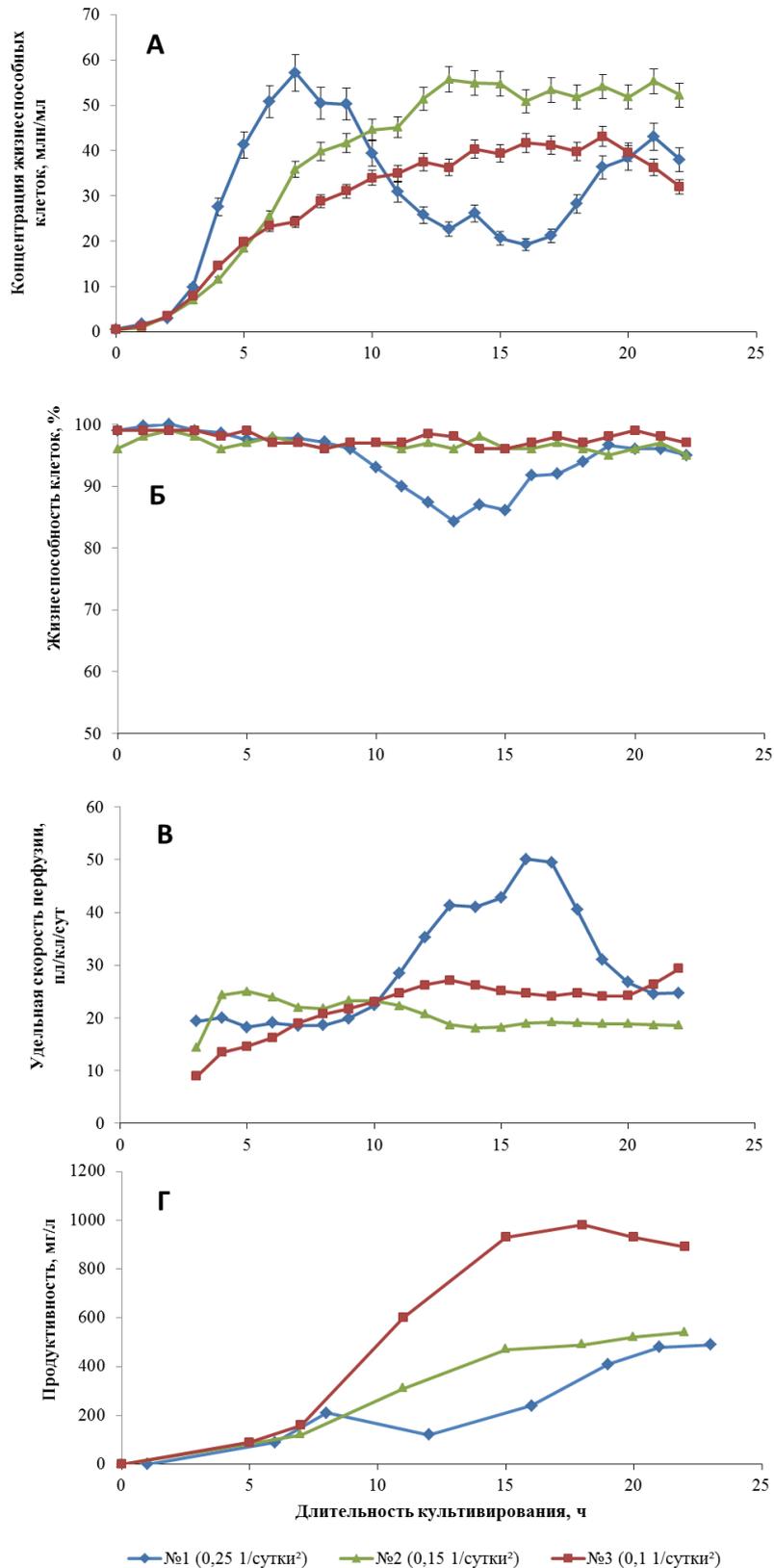


Рисунок 23 - Кривые роста (А) и жизнеспособности (Б) клеток, изменения удельной скорости перфузии (В) и продуктивности культуры (Г) при

различных ускорениях перфузии ( $n = 2$ , предел погрешностей обозначает размах)

В процессах №2 и №3 наблюдалась более низкая скорость роста клеток и отсутствие нутриентного лимитирования. Жизнеспособность культуры оставалась высокой в течение всего культивирования. До шестых суток динамика роста клеток в двух процессах не различалась (Рисунок 23 А).

Таблица 12 - Динамика изменения среднего диаметра клеток и их теоретического объёма при различных ускорениях перфузии

Время культивирования, сут	Ускорение перфузии, сут <sup>-2</sup>					
	0,25 (процесс №1)		0,15 (процесс №2)		0,10 (процесс №3)	
	Средний диаметр клетки, мкм	Теоретический объём клетки, пл	Средний диаметр клетки, мкм	Теоретический объём клетки, пл	Средний диаметр клетки, мкм	Теоретический объём клетки, пл
0	10,9	0,68	10,2	0,56	10,5	0,61
2	10,5	0,61	9,7	0,48	10,3	0,57
4	10,3	0,57	10,0	0,52	11,1	0,72
6	10,7	0,64	10,1	0,54	11,2	0,74
8	10,1	0,54	10,3	0,57	11,8	0,86
10	10,1	0,54	10,6	0,62	12,4	1,00
12	10,5	0,61	11,1	0,72	13,0	1,15
14	11,0	0,70	11,1	0,72	13,4	1,26
16	11,1	0,72	11,3	0,76	13,5	1,29
18	11,3	0,76	11,0	0,70	13,9	1,41
20	11,3	0,76	11,4	0,78	14,0	1,44
22	11,4	0,78	11,9	0,88	14,1	1,47

Начиная с седьмых суток, было отмечено замедление скорости пролиферации клеток в процессе с наименьшим ускорением перфузии ( $0,1 \text{ сут}^{-1}$ ). Одновременно с этим клетки начали увеличиваться в объёме. В течение следующих шести суток их объём в среднем увеличился в 2-2,5 раза (Таблица 12). Жизнеспособность в то же время сохранялась на высоком уровне (выше 96%), а удельная продуктивность увеличилась в 1,7-2 раза по отношению к нормальным клеткам. При этом удельная скорость перфузии к восьмым суткам выровнялась между всеми тремя процессами (Рисунок 23 В). Можно сделать вывод, что при одной и той же удельной скорости перфузии клетки могут демонстрировать кратно различающуюся удельную продуктивность, обусловленную некоторыми метаболическими сдвигами, произошедшими на этапе накопления биомассы. Можно также предположить, что метаболический сдвиг затрагивает не только количественную сторону экспрессии белка, но и качество целевой молекулы. Действительно, проведённое нами исследование профиля гликозилирования белка, экспрессируемого гипертрофированными клетками, показало уменьшение степени фукозилирования гликопротеина за счёт увеличения доли гликанов G0 и Man5 (Рисунок 24). В процессе с наименьшим ускорением перфузии доля гликана G0, не содержащего фукозу, выросла по ходу культивирования более чем в 6 раз, Man5 – более чем в 5 раз (Рисунок 24). Такое резкое и нетипичное изменение соотношения гликанов может быть признаком других «невидимых» изменений параметров качества молекулы, поскольку гликозилирование часто является хорошим маркером метаболического состояния клеток [51].

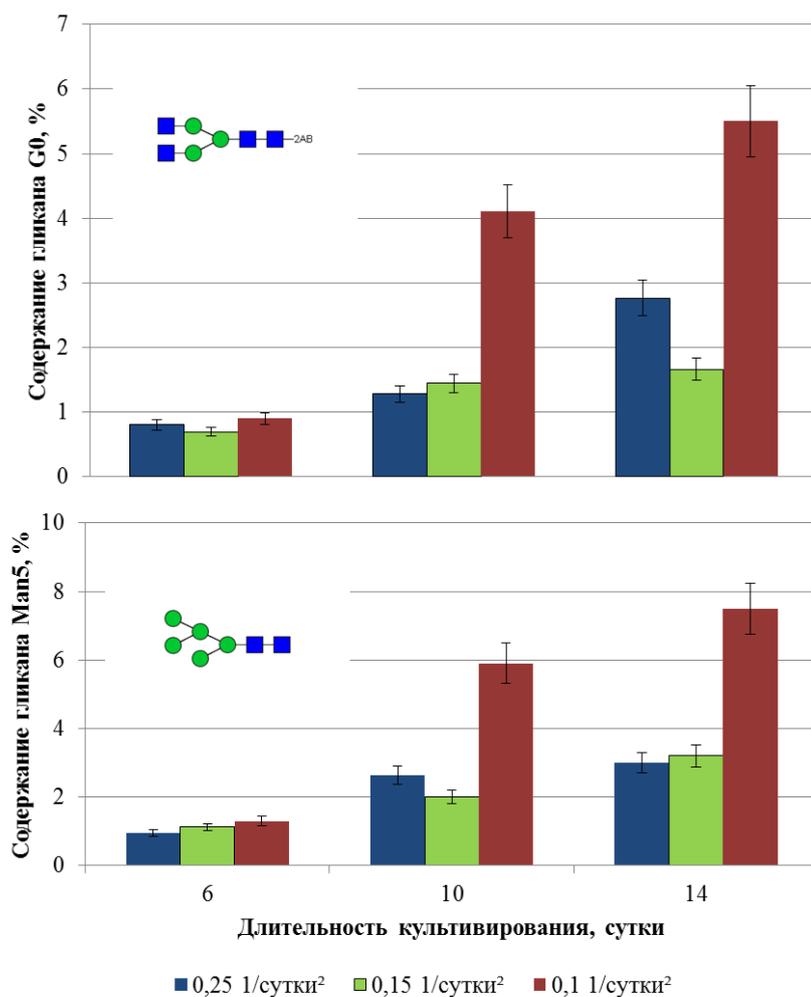


Рисунок 24 - Относительное содержание N-связанных гликанов G0 и Man5 в Fc-домене экспрессируемого белка при разном ускорении перфузии (n = 2, предел погрешностей обозначает размах)

Таблица 13 - Относительное содержание некоторых N-связанных гликанов в Fc-домене экспрессируемого белка при разном ускорении перфузии (приведены средние значения)

Тип гликана	Содержание гликана, %, на различные сутки культивирования в зависимости от ускорения перфузии, сут <sup>-2</sup>								
	0,25 (процесс №1)			0,15 (процесс №2)			0,10 (процесс №3)		
	6 сутки	10 сутки	14 сутки	6 сутки	10 сутки	14 сутки	6 сутки	10 сутки	14 сутки
G0F	74,0	68,7	73,5	75,3	77,0	76,6	70,3	70,2	68,1
G1F	15,1	18,3	17,7	17,9	9,9	9,5	16,2	7,1	6,5
G2F	1,4	1,8	1,6	1,7	1,2	1,1	1,5	0,4	0,3
G0	0,8	1,3	2,8	0,7	1,4	1,7	0,9	4,1	5,5
Man5	1,0	2,6	3,0	1,1	2,0	3,2	1,3	5,9	7,5

В процессе №2 не наблюдалось отклонений от нормального течения культивирования. На 12-й день клетки вышли на стационарную фазу, в течение которой скорость роста, жизнеспособность и продуктивность клеток, а также качество белка не претерпевали серьёзных изменений.

Если вернуться к удельной скорости перфузии, которая оказывает наибольший эффект на поведение культуры клеток в течение стационарной фазы культивирования, то можно отметить, что во всех трёх процессах с седьмого по десятый день УСП находилась примерно на одном уровне ( $20 \pm 2$  пл/кл/сут). При этом характеристики роста клеток на данном отрезке кардинально отличались, что свидетельствует о решающем влиянии первых дней перфузии. Более того, для процесса №2 на протяжении 6 суток (с 4 по 10 день культивирования) характерна более высокая удельная скорость перфузии, чем для процесса №1. Несмотря на это, скорость роста клеток в процессе №1 была существенно выше. По всей вероятности, решающее влияние на скорость пролиферации культуры в данном случае оказали момент включения перфузии и начальная скорость протока среды. Таким образом, 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. Оптимизация такого параметра, как ускорение перфузии, является более перспективной для разработки эффективных процессов культивирования.

Таким образом, в результате исследований было выявлено, что режим протока питательной среды на начальном этапе перфузионного процесса может существенно влиять на основные параметры роста и продуктивности культуры клеток СНО и свойства экспрессируемого белка.

Недостаточно быстрое увеличение скорости перфузии приводит к метаболическим перестроениям клетки, снижающим её пролиферативные характеристики, и, одновременно, увеличивающим удельную

продуктивность культуры. 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.

Слишком быстрое увеличение скорости перфузии поддерживает высокую удельную скорость роста культуры в течение всего этапа накопления биомассы, и при достижении максимальной скорости потока 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.

Таким образом, на основании двух этапов разработки был обоснован базовый процесс культивирования (Таблица 14). Три серии субстанции целевого белка (начало, середина и конец культивирования) были получены в ходе базового процесса по стандартной методике очистки и аналитически охарактеризованы. Ниже приводятся значения параметров качества этих серий (Таблица 15).

Таблица 14 - Основные параметры базового процесса культивирования в перфузионном режиме после оптимизации ускорения перфузии

Параметр процесса	Значение параметра	Способ контроля параметра
Начальная клеточная плотность, млн/мл	$0,3 \pm 0,03$	Счётчик клеток
Температура культивирования, °C	37 – фаза накопления биомассы, 34 – фаза получения продукционных сливов	Контролируемый нагрев основания платформы биореактора

Продолжение таблицы 14

Параметр процесса	Значение параметра	Способ контроля параметра
pH	6,9±0,05	Подача углекислого газа / раствора 5% NaOH
DO, %	40±10	3. Изменение частоты качаний платформы биореактора 4. Обогащение газовой смеси кислородом
Ускорение перфузии, 1/сут <sup>2</sup>	0,15	Встроенный весовой контроль подачи и отбора среды
Скорость перфузии, 1/сут	1,0	то же

Таблица 15 - Данные по качеству целевого белка, полученного в ходе базового процесса культивирования

Наименование показателя	Целевой диапазон значений показателя, %	Значение показателя, %, при длительности культивирования, сут		
		6	14	20
Изомеризация	3,0±1,0	<b>4,1</b>	<b>4,4</b>	4,0
Изоформы с различным зарядом, кислые формы	10,4±0,3	<b>9,0</b>	<b>9,8</b>	<b>9,3</b>
Неспаренные цистеины	26,0±1,0	<b>30,8</b>	27,0	25,2
С-концевые лизины	17,5±7,5	23	19	17
Fc-гликозилирование. Олигосахариды без фукозы (G0-N+G0+Man5+Man6+G1)	5-20	9,1	10,5	11,6
Fc-гликозилирование. Олигосахариды с галактозой (G1+G1F+G2+G2F+A1F)	5-40	38,0	37,3	36,0
Fc-гликозилирование. Маннозосодержащие олигосахариды (Man5+ Man6)	2-10	<b>1,8</b>	2,3	2,8
Гликирование	не установлен	не исследовали		

\*жирным шрифтом выделены значения, находящиеся за пределами целевого диапазона

## 2.6. Выбор скорости блидинга

Основным условием любого непрерывного процесса является его стабилизация на определённом уровне ключевых показателей 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.

Как было указано ранее, важным инструментом достижения стабильного состояния продуцента является регулярный отбор некоторой части клеток из биореактора для предотвращения перерастания культуры, так называемый *блидинг*. Вывод клеток из биореактора с помощью блидинга – необходимое условие установления *равновесного состояния* в ходе непрерывного культивирования.

Нами были проведены эксперименты по оценке влияния непрерывного отбора клеточной суспензии из биореактора на стабилизацию роста клеток, уровень экспрессии и профиль качества целевого белка. В качестве контроля выступал процесс без блидинга. Максимальную скорость протока питательной среды установили на уровне  $1,0 \text{ сут}^{-1}$ , pH культуральной жидкости поддерживали в диапазоне  $6,9 \pm 0,05$ . В фазе экспоненциального роста температура культивирования составляла  $37^\circ\text{C}$ , в фазе продукции –  $34^\circ\text{C}$ . Блидинг начинали с 8 суток культивирования. Ускорение перфузии поддерживали на уровне  $0,15 \text{ сут}^{-2}$ .

Результаты экспериментов представлены ниже (Рисунок 25, Таблица 16). 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. Наблюдаются колебания содержания N-гликанов, форм с неспаренными

цистеинами, а также примесей, связанных с процессом производства, таких как остаточные белки и ДНК клетки-хозяина. В процессе с блидингом на уровне  $0,1-0,2 \text{ сут}^{-1}$  наблюдается стабилизация концентрации клеток и выхода целевого белка. В случае блидинга  $0,2 \text{ сут}^{-1}$  отмечается более низкая равновесная концентрация клеток и продуктивность процесса, что обуславливает выбор в пользу блидинга  $0,1 \text{ сут}^{-1}$ .

В процессе с блидингом на уровне  $0,05 \text{ сут}^{-1}$  отмечается более высокая пиковая и средняя продуктивности, чем в вариантах с блидингом  $0,1$  и  $0,2 \text{ сут}^{-1}$ , однако, как ростовые характеристики, так и качество целевого белка нестабильны.

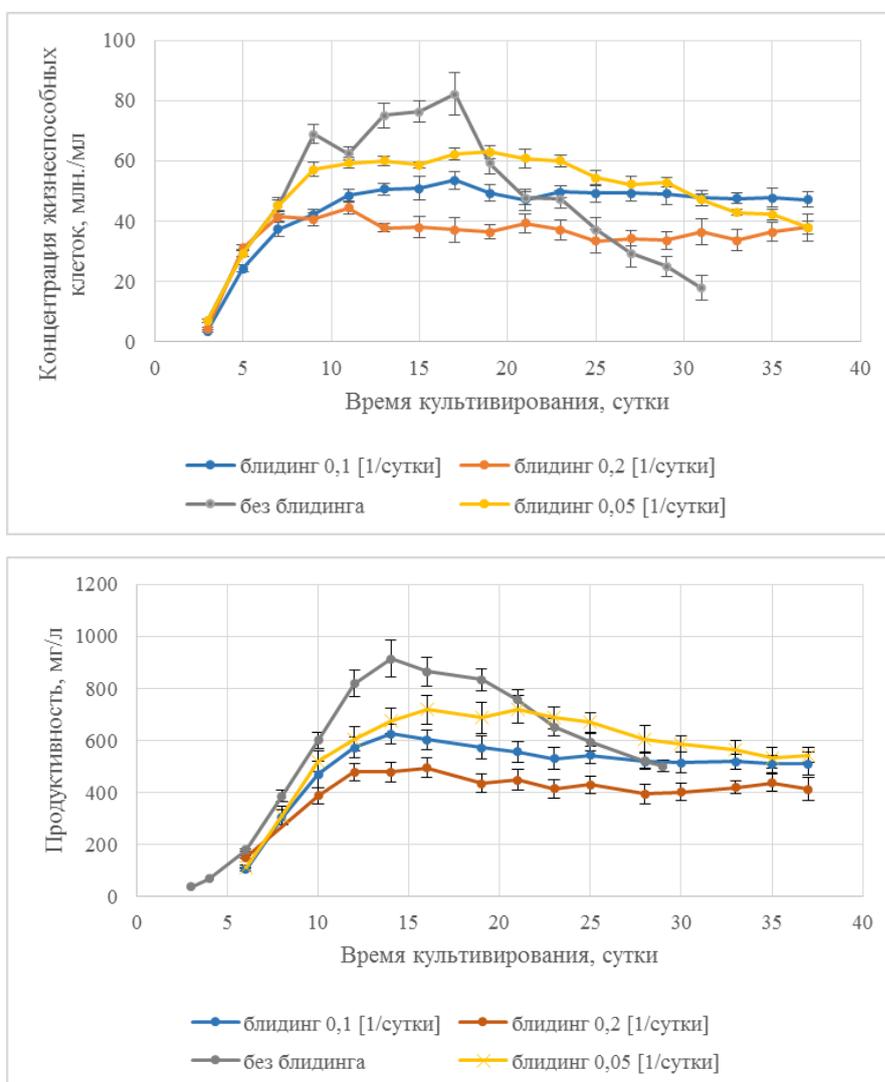


Рисунок 25 - Кривые роста и продуктивности клеток линии СНО 11А8 в перфузионных процессах с различной степенью блидинга ( $n = 2$ , предел погрешностей обозначает размах)

Таблица 16 - Содержание в целевом белке форм с неспаренными цистеинами, гликанов без фукозы (G0-N+G0+Man5+Man6+G1) и гликанов с галактозой (G1+G1F+G2+G2F+A1F) в зависимости от длительности процесса и уровня блидинга (n = 2, приведены средние значения)

Скорость отбора суспензии клеток (блидинг), сут <sup>-1</sup>	Содержание форм с неспаренными цистеинами, %, при длительности культивирования, сут (целевой диапазон: 25-27%)			Содержание гликанов без фукозы, %, при длительности культивирования, сут (целевой диапазон: 5-20%)			Содержание гликанов с галактозой, %, при длительности культивирования, сут (целевой диапазон: 5-40%)		
	15	25	35	15	25	35	15	25	35
0	26,4	31,2	-	11,2	16,5	-	36,5	25,7	-
0,05	27,1	27,6	29,5	10,8	13,5	17,8	36,9	31,2	27,4
0,1	26,9	26,2	26,5	10,5	11,8	11,3	37,4	35,1	34,7
0,2	26,7	27,3	27,2	9,8	10,2	10,5	37,9	38,4	38,0

На основании проведённых экспериментов был дополнен профиль базового процесса культивирования (Таблица 17).

Таблица 17 - Основные параметры базового процесса культивирования в перфузионном режиме после оптимизации скорости блидинга

Параметр процесса	Значение параметра	Способ контроля параметра
Начальная клеточная плотность, млн/мл	0,5±0,05	Счётчик клеток
Температура культивирования, °С	37 – фаза накопления биомассы, 34 – фаза получения продукционных сливок	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 <sup>2</sup>	0,15	Встроенный весовой контроль подачи и отбора среды
Скорость перфузии, 1/сут	1,0	то же
Скорость блидинга, 1/сут	0,1	то же

## 2.7. Оптимизация профиля изоформ целевого белка с различными зарядами

Обеспечение постоянно высокого качества моноклональных антител осложняется их крайней гетерогенностью [123, 23, 8]. Это справедливо для всех антител благодаря разнице в гликозилировании, нестабильности в ходе производства и терминального процессинга [89].

Известно, что культивирование клеток продуцента оказывает наибольшее влияние на природу и уровень модификаций, определяющих гетерогенность моноклональных антител [89]. Такие параметры процесса, как состав питательной среды, уровень рН, продолжительность и температура культивирования имеют критическое значение в управлении уровнем кислых изоформ целевого белка [78, 58, 9, 86, 95, 131]. Несмотря на значительное количество работ, посвящённых данному вопросу, изучение влияния параметров культивирования на состав и уровень кислых изоформ биологических препаратов на основе моноклональных антител остаётся актуальной задачей биофармацевтической отрасли. Эта тематика особенно важна применительно к разработке биоаналогичных лекарственных препаратов из-за использования процессов производства, отличных от оригинальных [86].

В данном исследовании изучали влияние способа и условий культивирования клеток продуцента на содержание кислых изоформ потенциального биоаналога омализумаба. Необходимо отметить, что оригинальный препарат отличается сравнительно низким содержанием кислых изоформ, не свойственное моноклональным антителам, произведённым с помощью периодического культивирования. В связи с этим особый интерес представляло исследование влияния перфузионного культивирования на изоформный состав целевого белка, поскольку, по литературным данным, непрерывные процессы по сравнению с периодическими существенно снижают уровень кислых изоформ экспрессируемых молекул [113].

Основной вклад в гетерогенность зарядовых форм рекомбинантных белков вносят неферментативные реакции, сильно зависящие от окружающих условий, таких как рН, температура и длительность экспозиции. В связи с этим периодическое культивирование клеток-продуцентов, имеющее продолжительность 2-3 недели и температуру среды в реакторе 30-37°C, оказывается не выгодным с точки зрения получения гомогенного продукта. Нахождение условий, обеспечивающих минимальный уровень гетерогенности белка, является актуальной задачей в ходе разработки процесса производства инновационных молекул. В свою очередь, при разработке биоаналоговых препаратов усилия направлены на воспроизведение профиля гетерогенности оригинального белка.

При разработке биоаналога омализумаба мы столкнулись с тем, что содержание кислых изоформ в оригинальном препарате находится на достаточно низком уровне (10-11%, Рисунок 26), не характерном для антительных препаратов, получаемых с помощью культивирования в режиме фэд-батч, таких как, например, трастузумаб, инфликсимаб, бевацизумаб и др. [17, 21, 137]. Разработка процесса культивирования, имеющего высокий выход по целевому белку и одновременно эффективного в плане воспроизведения профиля изоформ оригинального препарата, осложнялось тем, что условия, способствующие более высокой продуктивности, одновременно негативно сказываются на содержании кислых изоформ.

На первом этапе изучали влияние на количество кислых изоформ таких параметров периодического процесса, как уровень рН и длительность культивирования.

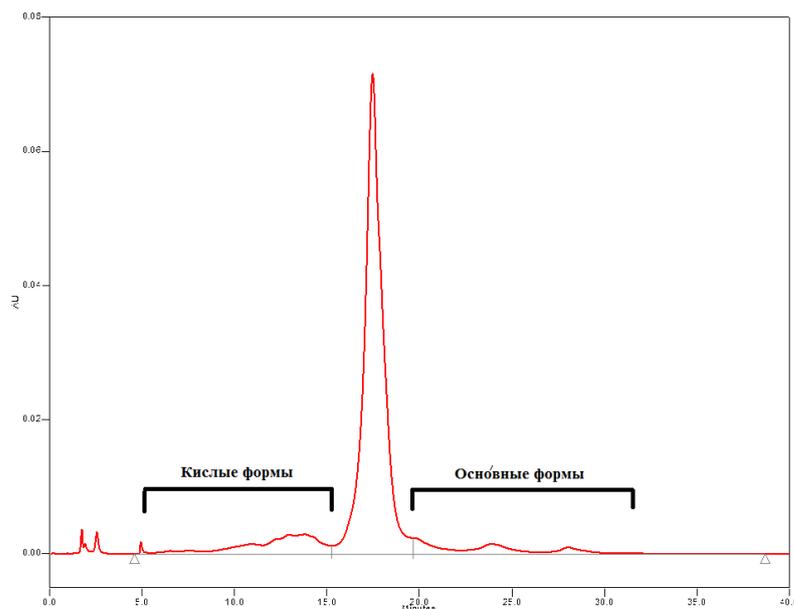


Рисунок 26 - Профиль изоформ с различными зарядами моноклонального антитела омализумаб (препарат «Ксолар», Новартис)

### 2.7.1. Оценка влияния уровня рН и продолжительности культивирования на содержание кислых изоформ целевого белка при культивировании в режиме фед-батч

В ходе оценки влияния уровня рН на содержание кислых изоформ целевого белка исследовали несколько значений данного технологического параметра в диапазоне от 6,7 до 7,1 с шагом 0,1 ед. рН. При этом профиль температуры и продолжительность процесса культивирования оставались одинаковыми во всех вариантах (37-32°C и 14 суток).

Из приведённых графиков (Рисунок 27) видно, что варьирование уровня рН в ходе культивирования не сказывается существенным образом ни на динамике роста клеток, ни на финальной продуктивности (за исключением процесса при рН=6,7, где наблюдается некоторое замедление роста клеток и падение выхода белка). В то же время, снижение кислотности среды ведёт к ощутимому падению содержания кислых форм целевого белка с 23% при рН=7,1 до 15% при рН=6,8.

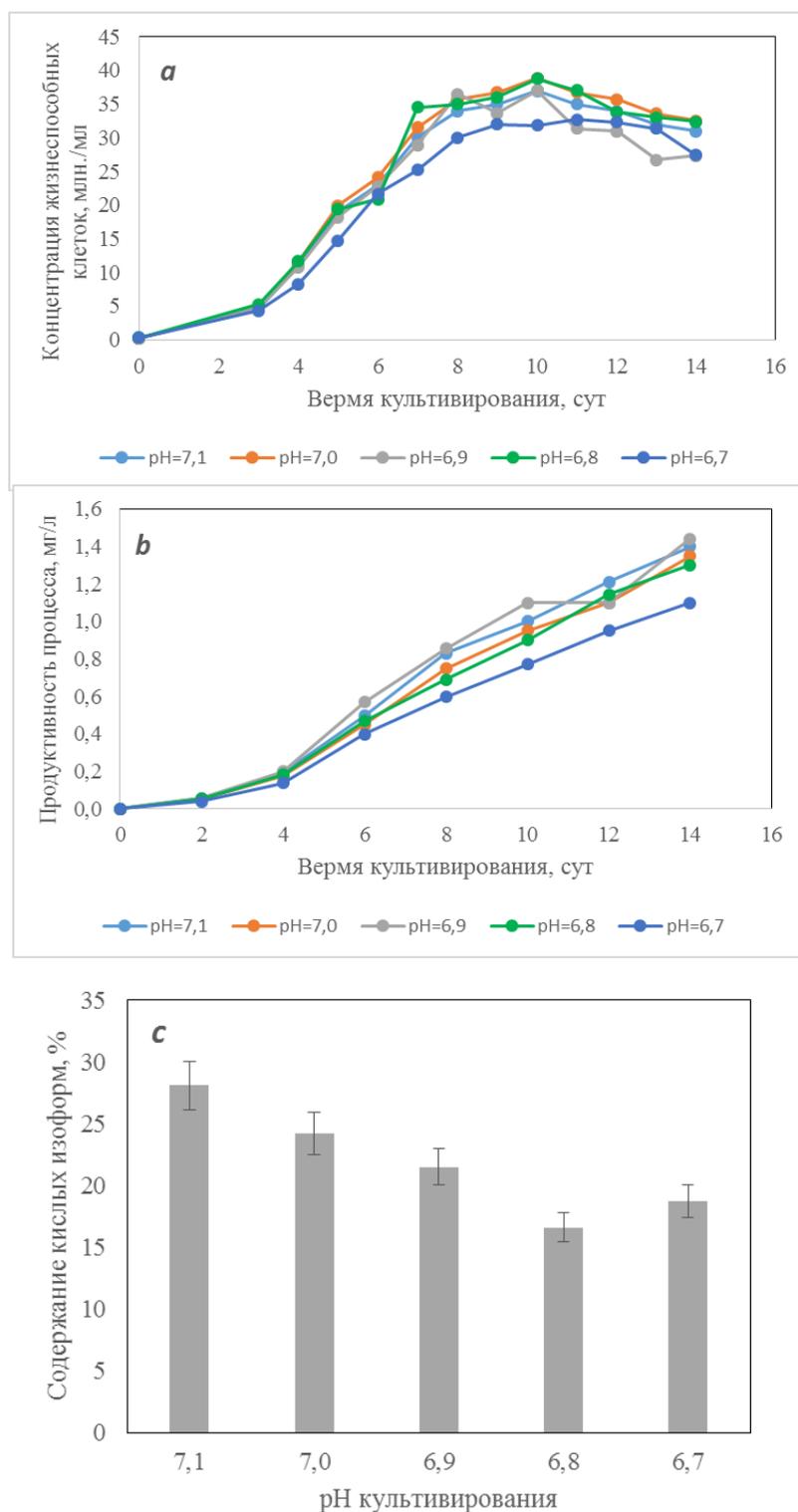


Рисунок 27 - Эффект уровня рН питательной среды на (а) рост клеток, (б) продуктивность процесса и (с) содержание кислых изоформ целевого белка на 14-ые сутки культивирования ( $n = 3$ , на (а) и (б) для лучшей визуализации приведены средние значения, предел погрешностей на (с) обозначает размах)

В той же серии экспериментов исследовали влияние продолжительности процесса культивирования на содержание кислых

изоформ в целевом антителе. Отбор проб культуральной жидкости для анализа зарядового состояния экспрессированного белка производили из каждого реактора один раз в два дня, начиная с восьмых суток культивирования. Во всех вариантах наблюдалась тенденция к заметному приросту кислых изоформ с течением процесса (Таблица 18). Можно отметить, что в процессах с рН-статированием на уровне 6,7 и 6,8 на восьмые и десятые сутки содержание кислых изоформ практически соответствовало оригинальному препарату. Однако завершение процесса на столь раннем этапе ведёт к существенному снижению выхода белка (на 30-50%) и может быть экономически нецелесообразно.

Таблица 18 - Зависимость содержания кислых изоформ целевого белка от времени культивирования и рН среды в режиме фэд-батч (n = 3, приведены средние значения)

Продолжительность культивирования, сут	Содержание кислых изоформ в целевом белке, % при рН 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

#### 2.7.2. Оценка влияния параметров культивирования в режиме перфузии на содержание кислых изоформ целевого белка

С помощью подбора условий культивирования в режиме фэд-батч мы смогли приблизиться к уровню кислых изоформ, соответствующему оригинальному препарату, однако, повторить его удалось лишь с существенной потерей продуктивности процесса. Поэтому на втором этапе работы исследовали качество целевого белка, получаемого с помощью перфузионного культивирования. Исходя из литературных данных, непрерывный процесс должен способствовать существенному снижению

кислых форм белка, образующихся в результате неферментативных реакций в ходе длительной экспозиции целевой молекулы в жёстких условиях биореактора. Среднее время пребывания целевого белка в перфузионных биореакторах в разы короче, чем в реакторах, работающих в периодическом режиме, и зависит, прежде всего, от скорости потока питательной среды, определяемой разработчиком процесса.

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 оценивали содержание кислых изоформ целевого белка, получаемого на разных стадиях перфузионного процесса. Максимальную скорость потока питательной среды установили на уровне  $1,0 \text{ сут}^{-1}$ , pH культуральной жидкости поддерживали в диапазоне  $6,9 \pm 0,03$ . Температурный режим был аналогичен используемому в фэд-батч процессах. В фазе экспоненциального роста температура культивирования составляла  $37^\circ\text{C}$ , в фазе продукции –  $32^\circ\text{C}$ . Ниже (Рисунок 28 а) представлены график роста клеток и профиль их жизнеспособности.

В результате анализа белка, полученного в ходе процесса, было установлено, что количество кислой фракции меняется в течение культивирования незначительно, не увеличиваясь даже в фазе отмирания клеток (Рисунок 28 б), и составляет  $9,3 \pm 0,5\%$ . Этот факт, в целом, подтверждает тезис о неферментативной природе кислых изоформ целевой молекулы и позволяет предположить, что эффективно управлять данным параметром качества в перфузионном процессе можно, в частности, с помощью варьирования скорости потока среды, определяющей среднее время пребывания продукта в биореакторе.

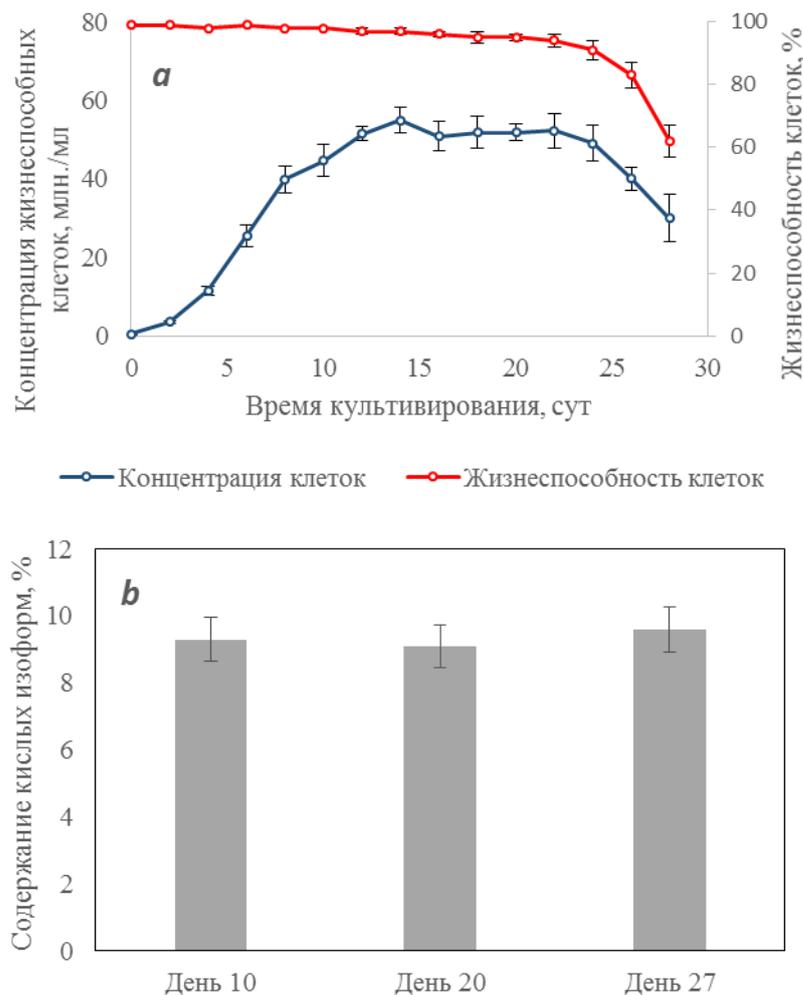


Рисунок 28 - Графики роста клеток и изменения их жизнеспособности в ходе перфузионного культивирования (а), а также диаграмма содержания кислых изоформ белка на разных этапах процесса (b) ( $n = 2$ , предел погрешностей обозначает размах)

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 оригинальном препарате. Наиболее гомогенный препарат был получен, как и ожидалось, при максимальной скорости протока питательной среды (Таблица 19).

Ещё одним существенным преимуществом перфузионного культивирования, как видно из таблицы, является средняя суточная производительность по целевому белку. При скорости потока среды  $1,0 \text{ сут}^{-1}$  она составляет около 550 мг с литра рабочего объёма биореактора. Для фэд-батч процесса средняя суточная производительность находится на отметке около 100 мг/л (при финальной продуктивности 1400 мг/л за 14-дневный процесс).

Таблица 19 - Зависимость максимальной концентрации клеток, продуктивности процесса и содержания кислых изоформ от скорости потока питательной среды в ходе перфузионного культивирования ( $n = 2$ )

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

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

Данных недостатков можно избежать при использовании процесса перфузионного культивирования. Благодаря малому времени пребывания целевого белка в биореакторе в режиме перфузии возможно получать высоко гомогенный белок с низким содержанием кислых изоформ. Варьирование скорости потока питательной среды позволяет добиваться приемлемого

уровня кислой фракции, установленного разработчиком лекарственного средства.

На основании полученных данных была изменена скорость протока среды в профиле базового процесса культивирования (Таблица 20).

Таблица 20 - Основные параметры базового процесса культивирования в перфузионном режиме после оптимизации скорости протока среды

Параметр процесса	Значение параметра	Способ контроля параметра
Начальная клеточная плотность, млн/мл	0,5±0,05	Счётчик клеток
Температура культивирования, °С	37 – фаза накопления биомассы, 34 – фаза получения продукционных сливок	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 <sup>2</sup>	0,15	Встроенный весовой контроль подачи и отбора среды
Скорость перфузии, 1/сут	<b>0,75</b>	то же
Скорость блидинга, 1/сут	0,1	то же

## 2.8. Проведение установочного лабораторного процесса

Используя оптимизированные параметры (таблица 20), 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. Результаты анализа критических показателей качества субстанции представлены ниже (Таблица 21, Рисунок 29)

Таблица 21 - Данные по качеству целевого белка, полученного в ходе оптимизированного базового процесса культивирования

Наименование показателя	Целевой диапазон значения показателя, %	Значение показателя, % при продолжительности процесса культивирования, сут / (номер серии фармсубстанции)						
		7 (№1)	11 (№2)	15 (№3)	19 (№4)	23 (№5)	27 (№6)	31 (№7)
Изомеризация	3,0±1,0	4,2	4,5	4,3	3,9	4,1	4,3	3,7
Изоформы с различным зарядом, кислые формы	10,4±0,3	11,6	10,5	10,6	10,3	10,7	10,3	10,5
Неспаренные цистеины	26,0±1,0	31,7	27,0	25,2	24,7	25,1	24,5	24,9
С-концевые лизины	17,5±7,5	23	19	17	18	16	17	18
Fc-гликозилирование. Олигосахариды без фукозы	5-20	9,2	10,3	11,4	11,7	11,2	12,0	11,8
Fc-гликозилирование. Олигосахариды с галактозой	5-40	38,0	37,3	36,0	35,4	35,9	34,9	35,4
Fc-гликозилирование. Маннозосодержащие олигосахариды	2-10	1,8	2,3	2,8	3,1	2,7	3,2	2,5

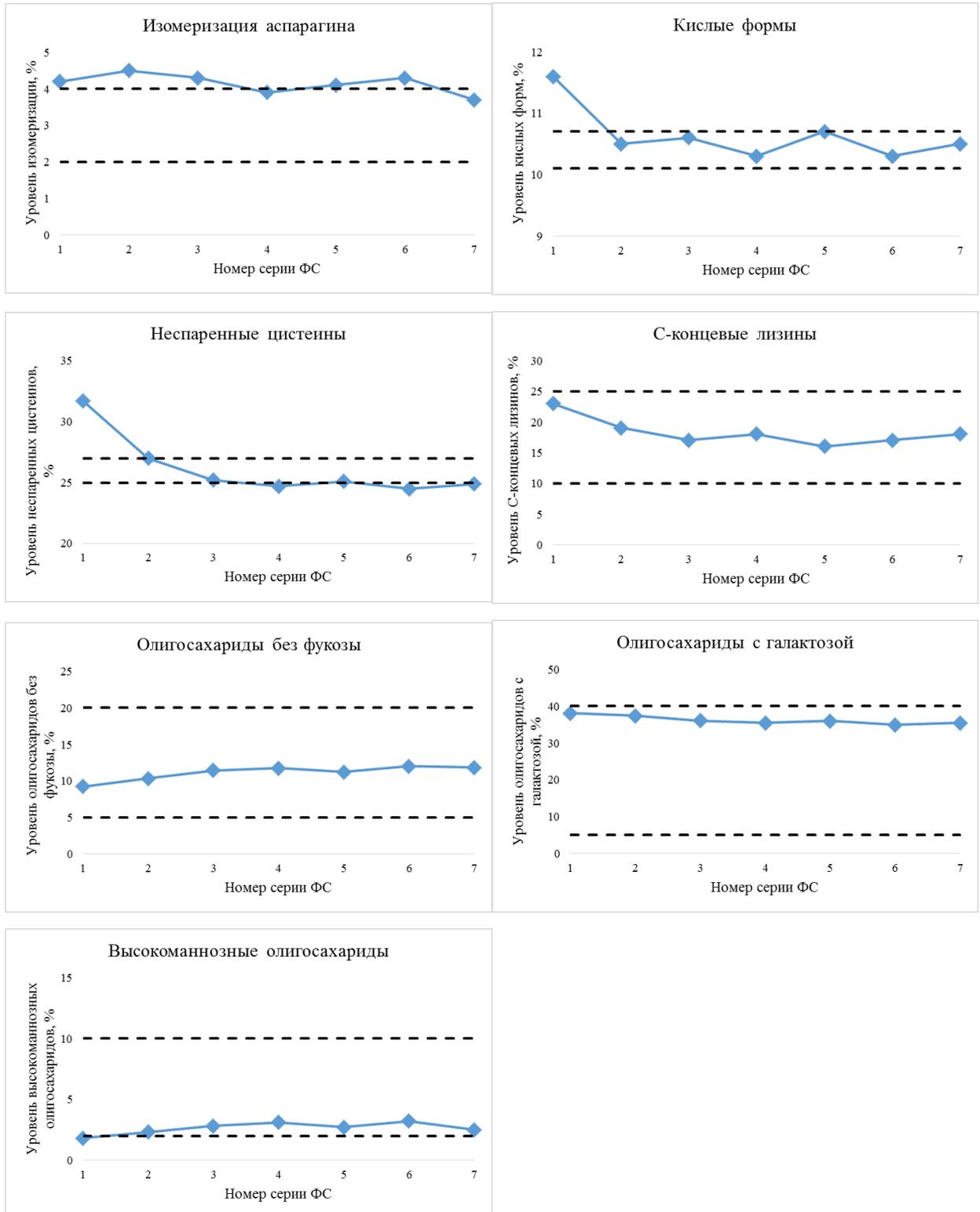


Рисунок 29 - Данные по качеству серий ФС GNR044, полученных в ходе оптимизированного базового процесса культивирования

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.

Также, 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. Уточнённые целевые диапазоны показателей качества потенциального биоаналога приведены ниже (Таблица 22).

Таблица 22 - Уточнённые в результате проведённой разработки процесса культивирования приемлемые диапазоны показателей качества потенциального биоаналога омализумаба

Наименование показателя	Диапазон значений показателей качества омализумаба, %		
	в 4 сериях оригинального препарата	в спецификации оригинального препарата	установленный после оптимизации процесса
Изомеризация Asp	3,0±1,0	не более 10	<b>3,3±1,3</b>
Изоформы с различным зарядом, кислый пик	10,4±0,3	не установлен	10,4±0,3
Неспаренные цистеины	26,0±1,0	не более 31	<b>25,7±1,3</b>

## Продолжение таблицы 22

Наименование показателя	Диапазон значений показателей качества омализумаба, %		
	в 4 сериях оригинального препарата	в спецификации оригинального препарата	установленный после оптимизации процесса
С-концевые лизины, сумма щелочных пиков	13,5±1,0	не установлен	17,5±7,5
Fc-гликозилирование. Олигосахариды без фукозы, (G0-N+G0+Man5+Man6+G1)	11,6-15,2	не установлен	5-20
Fc-гликозилирование. Олигосахариды с галактозой, (G1+G1F+G2+G2F+A1F)	8,6-32,5	не установлен	5-40
Fc-гликозилирование. Маннозосодержащие олигосахариды, (Man5+ Man6)	6,3-8,9	не установлен	2-10

## 2.9. 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  $\text{CO}_2$  в культуральной среде и какова чувствительность культуры клеток к экстремальным значениям  $p\text{CO}_2$  на различных этапах процесса культивирования. Задачей настоящего этапа исследований стало моделирование неблагоприятных с точки зрения растворённого  $\text{CO}_2$  условий и оценка их влияния на культуру клеток СНО 11А8. Было изучено поведение культуры как в периодическом, так и непрерывном режимах культивирования на различных этапах роста культуры.

### 2.9.1. Культивирование в режиме батч в колбах Эрленмейера.

Начальные эксперименты в колбах Эрленмейера были направлены на оценку того, насколько типична реакция клона 11А8 на пониженную и повышенную концентрации углекислого газа в культуральной жидкости. Было установлено, что при культивировании в колбах скорость роста исследуемых клеток имела характерную зависимость от концентрации углекислого газа в атмосфере инкубатора (Рисунок 30). Отсутствие  $\text{CO}_2$  полностью останавливало рост клеток, а его 20%-ная концентрация сильно ингибировала развитие культуры, снижая удельную скорость роста примерно в 2 раза относительно контрольного эксперимента ( $0,55 \pm 0,05 \text{ сут}^{-1}$  при 20%  $\text{CO}_2$  против  $0,97 \pm 0,1 \text{ сут}^{-1}$  при 5%  $\text{CO}_2$ ). Кроме того, в условиях повышенной концентрации  $\text{CO}_2$  после третьих суток культивирования была отмечена значительная агрегация клеток и адгезия их к стенкам колб. Около 30-40% культуры перешло в агрегаты размером 5-10 клеток.

Также было установлено, что уровень снижения удельной скорости роста при 20% CO<sub>2</sub> не зависит от посевной концентрации клеток в диапазоне от 0,1 до 1,0 млн. кл/мл (графики не приведены).

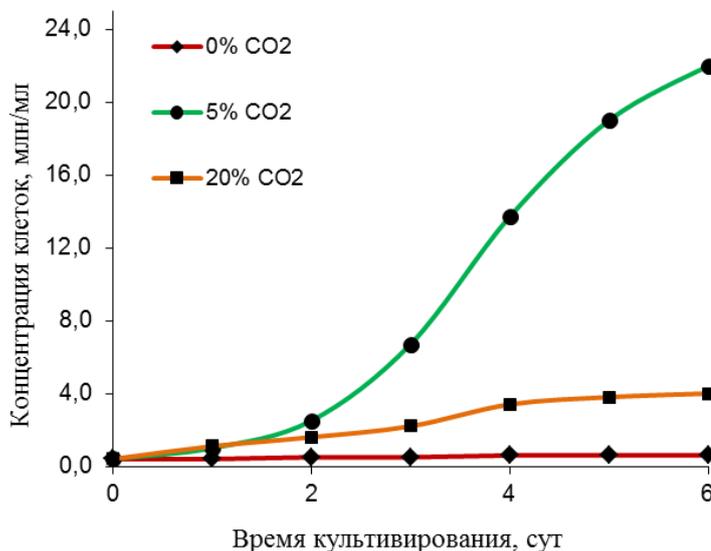


Рисунок 30 - Кривые роста клеток клона А в колбах, помещенных в шейкер-инкубатор с газовой атмосферой, содержащей 0%, 5% и 20% CO<sub>2</sub>

### 2.9.2. Культивирование в режиме фэд-батч в биореакторах с мешалкой

В литературных источниках приводятся данные экспериментов, в которых избыточное или недостаточное содержание CO<sub>2</sub> в среде поддерживается, в основном, с самого начала культивирования, вызывая сильное или даже полное ингибирование роста клеток [45, 77]. Однако на практике нежелательные изменения концентрации углекислого газа возникают не с начала процесса, а на более поздней стадии культивирования, когда концентрации клеток достигают пиковых значений (для промышленных реакторов), либо в момент переключения контроля рН с подачи CO<sub>2</sub> на подачу щёлочи (в лабораторных реакторах). В данной работе изучалось негативное влияние изменения рСО<sub>2</sub>, возникающего на различных этапах культивирования. На примере фэд-батч процессов, проведённых в лабораторных с реакторах рабочим объемом 1,2 л, исследовано воздействие недостаточного либо избыточного рСО<sub>2</sub> на ход культивирования,

возникающее на ранней или поздней стадии экспоненциально роста (соответственно, при концентрации клеток  $1,5 \pm 0,3$  и  $5 \pm 0,5$  млн./мл).

Когда стрессовые условия создавались при достижении клеточной плотности  $1,5 \pm 0,3$  млн./мл (Рисунок 31, Рисунок 32), при 20%  $\text{CO}_2$  метаболизм клеток сильно замедлялся по сравнению с контролем: кривые роста культуры и образования лактата заметно растянуты, на седьмые сутки количество клеток вдвое ниже, чем при 5%  $\text{CO}_2$ . При низком содержании  $\text{CO}_2$  (1%) скорость роста культуры близка к контрольному варианту, но концентрация клеток на седьмые сутки ниже на 20%. При этом резко изменяется динамика образования молочной кислоты, не наблюдается характерного перестроения метаболизма с образования лактата на его утилизацию, что, как правило, негативно сказывается на жизнеспособности культуры и ее продуктивности в более длительном процессе [136].

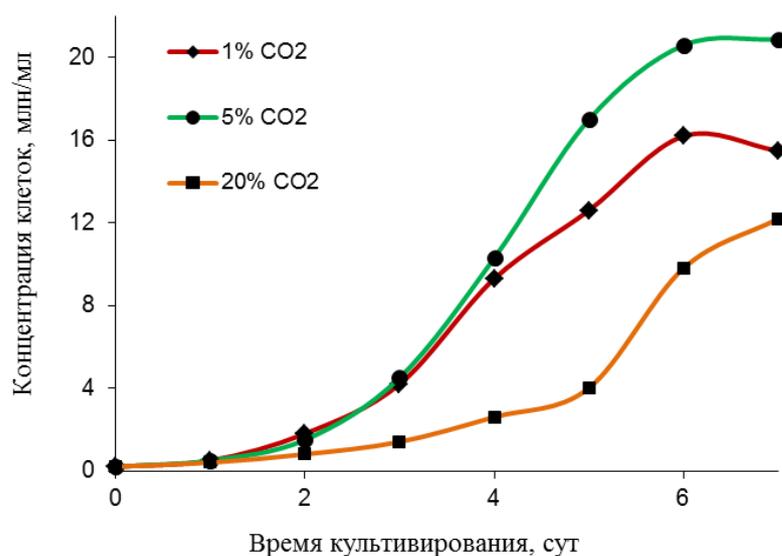


Рисунок 31 - Кривые роста клеток клона А в режиме фэд-батч (изменение  $\text{pCO}_2$  на ранней логарифмической стадии роста)

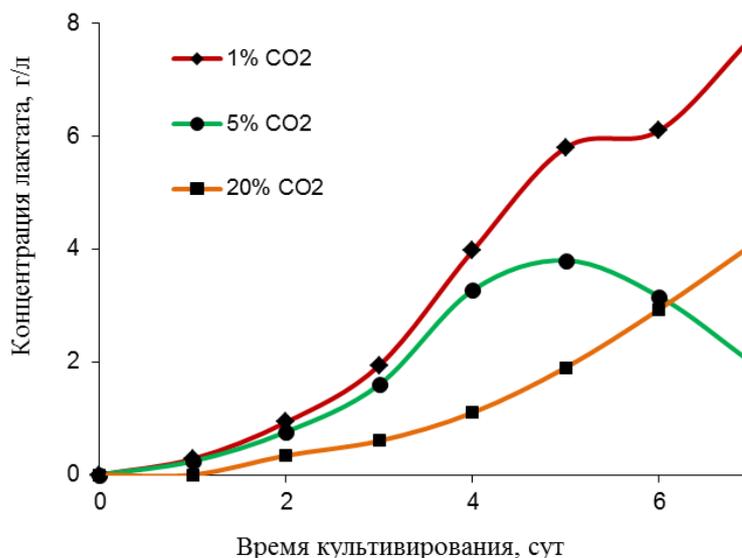


Рисунок 32 - Изменение концентрации лактата в ходе фед-батч культивирования (изменение  $p\text{CO}_2$  на ранней логарифмической стадии роста)

Культура реагировала принципиально иначе, когда стрессовые условия создавались при достижении клеточной плотности  $5 \pm 0,5$  млн./мл (Рисунок 33, Рисунок 34). Варьирование  $p\text{CO}_2$  не отразилось на росте клеток, хотя потребление лактата было ослаблено при пониженной концентрации углекислого газа. В литературе упоминается сильное ингибирующее воздействие избытка  $\text{CO}_2$  в период экспоненциального роста культуры и ослабление данного эффекта во время стационара [77, 138]. В данной работе показано, что культура, чувствительная к колебаниям  $p\text{CO}_2$  на ранней экспоненциальной стадии роста, приобретает относительную устойчивость к ним уже в период поздней логарифмической фазы.

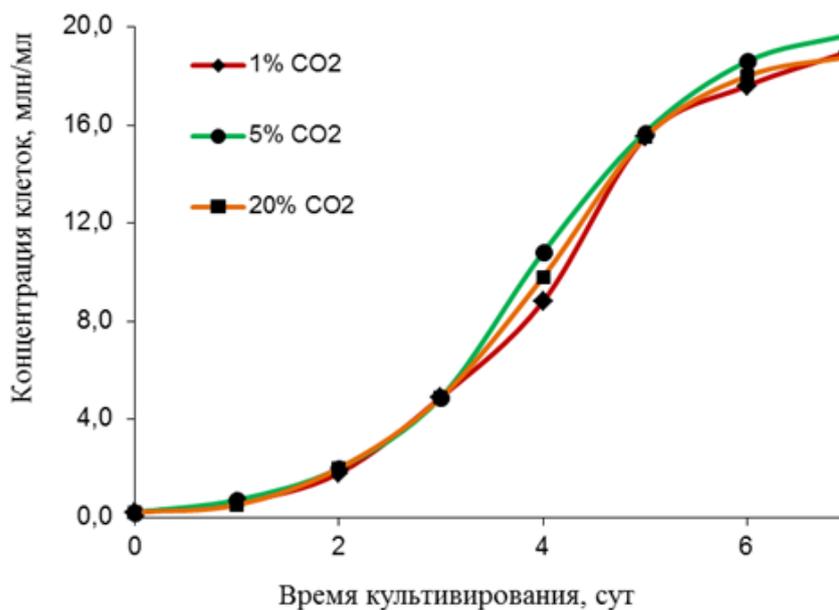


Рисунок 33 - Кривые роста клеток клона А в режиме фед-батч (изменение рСО<sub>2</sub> на поздней логарифмической стадии роста)

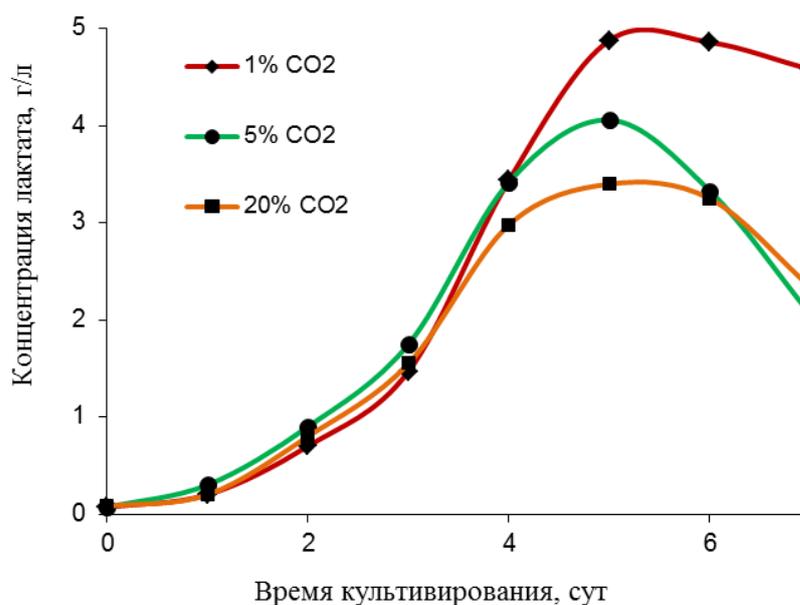


Рисунок 34 - Изменение концентрации лактата в ходе фед-батч культивирования (изменение рСО<sub>2</sub> на поздней логарифмической стадии роста)

Ниже приведены значения ключевых параметров процессов культивирования в режиме фед-батч при различных концентрациях СО<sub>2</sub> (Таблица 23). Изменение рСО<sub>2</sub> при клеточной плотности  $5 \pm 0,5$  млн./мл практически не влияет на удельную скорость роста культуры и урожай

клеток. Аналогичное воздействие при концентрации клеток  $1,5 \pm 0,3$  млн./мл заметно снижает скорость роста и финальную клеточную плотность, причем при недостатке  $\text{CO}_2$  эффект выражен ярче, чем при его избытке. Концентрация углекислого газа никак не сказывается на жизнеспособности культуры, но значительно влияет на финальный уровень лактата. Так при снижении концентрации  $\text{CO}_2$  до 1% при клеточной плотности  $1,5 \pm 0,3$  млн./мл количество лактата в четверо выше, чем в контрольном варианте.

Таблица 23 - Сравнение основных параметров процессов культивирования с различной концентрацией растворенного  $\text{CO}_2$  ( $n = 2$ ).

Наименование параметра	Значение параметра в контрольном процессе	Значение параметра в случае инициации $\text{CO}_2$ -стресса при концентрации клеток, млн.кл/мл			
		1,5		5	
Концентрация $\text{CO}_2$ , %	5	1	20	1	20
Максимальная удельная скорость роста, сут <sup>-1</sup>	$1,32 \pm 1,1$	$0,78 \pm 0,07$	$1,12 \pm 0,1$	$1,34 \pm 1,12$	$1,3 \pm 1,12$
Максимальная концентрация клеток, млн./мл	$20 \pm 1,1$	$12 \pm 0,5$	$16 \pm 0,7$	$19 \pm 1$	$19 \pm 1$
Жизнеспособность клеток на 7 сутки, %	98	96	94	96	95
Концентрация лактата на 7 сутки, г/л	$2,0 \pm 0,2$	$7,8 \pm 0,7$	$4,1 \pm 0,4$	$4,6 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,3$

### 2.9.3. Культивирование в непрерывном режиме в реакторах волнового типа

В данном исследовании оценивали влияние повышенного уровня  $\text{pCO}_2$  на состояние клеточной культуры, вышедшей на пиковую плотность в перфузионном процессе культивирования (Рисунок 35). Такая ситуация характерна для биореакторов пилотного и промышленного масштабов, имеющих неэффективную стратегию удаления углекислого газа из среды. Также исследовали влияние низкого уровня  $\text{pCO}_2$  на раннем этапе перфузионного культивирования, что присуще лабораторным процессам с искусственным контролем pH (Рисунок 36, Рисунок 37).

Было показано, что достигшая стационарного состояния культура устойчива к 20%-ной концентрации  $\text{CO}_2$ . Кривая роста, жизнеспособность и продуктивность клеток не отличаются от контрольного варианта. Напротив, недостаток углекислого газа на ранней логарифмической стадии развития культуры сказывается таким образом, что нормальное переключение метаболизма с формирования лактата на его потребление не происходит (рис. 8) и в результате резко падает концентрация жизнеспособных клеток (Рисунок 36).

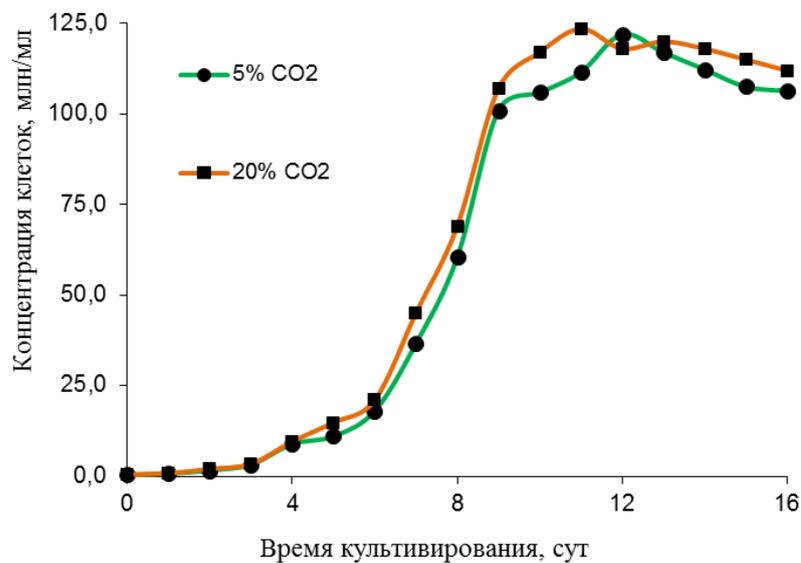


Рисунок 35 - Кривые роста клеток клона А в режиме перфузия (изменение  $p\text{CO}_2$  на стационарной стадии роста)

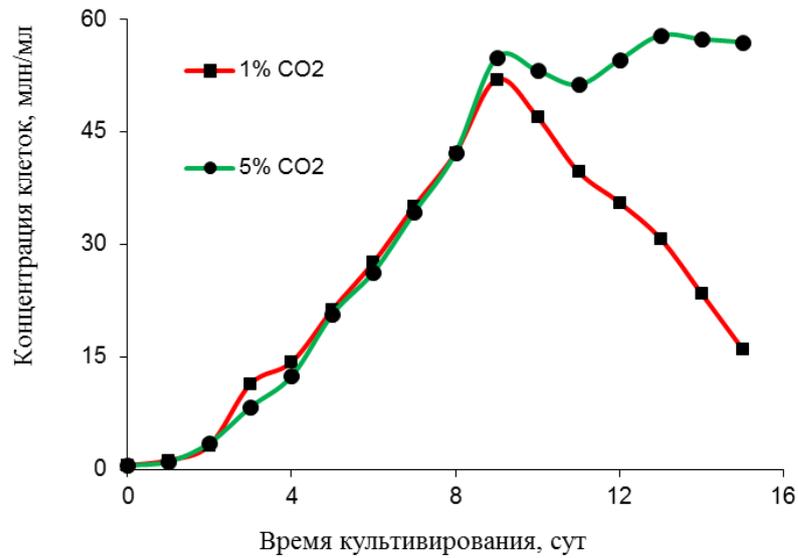


Рисунок 36 - Кривые роста клеток клона А в режиме перфузия (изменение  $p\text{CO}_2$  на ранней логарифмической стадии роста)

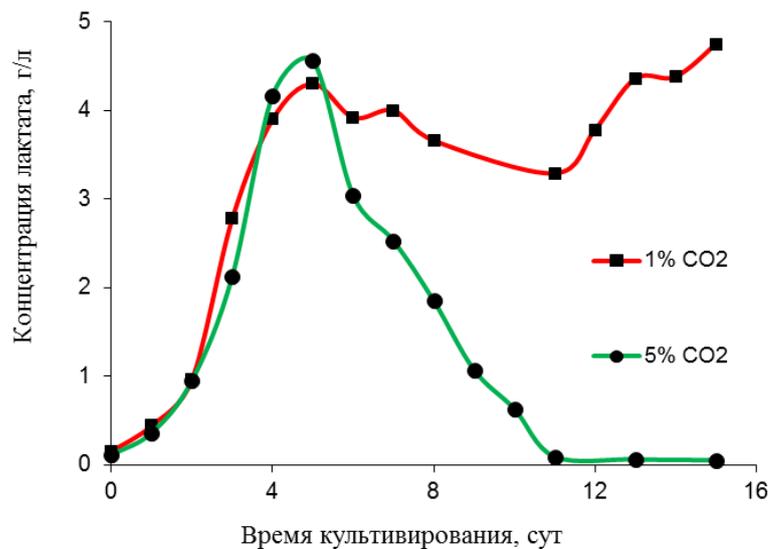


Рисунок 37 - Изменение концентрации лактата в ходе перфузионного процесса культивирования (изменение  $p\text{CO}_2$  на ранней логарифмической стадии роста)

Проведенное исследование показало, что культура клеток СНО 11А8 приобретает устойчивость к высокому  $p\text{CO}_2$  уже на поздней экспоненциальной стадии развития при периодическом культивировании, а в устоявшемся перфузионном процессе 20%-ная концентрация  $\text{CO}_2$  практически не снижает жизнеспособности клеток и выхода целевого продукта. 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  $\text{CO}_2$ , 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.

Проведенный по утверждённой спецификации анализ качества экспрессируемого целевого антитела показал, что в установленных диапазонах растворённого углекислого газа критические показатели качества не выходят из целевых диапазонов.

## 2.10. 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 (Рисунок 38, Рисунок 39, Рисунок 40, Рисунок 41). 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. В сравнение также включены биохимические показателя, анализируемые с помощью биохимического анализатора Bioprofile 400 (Nova).

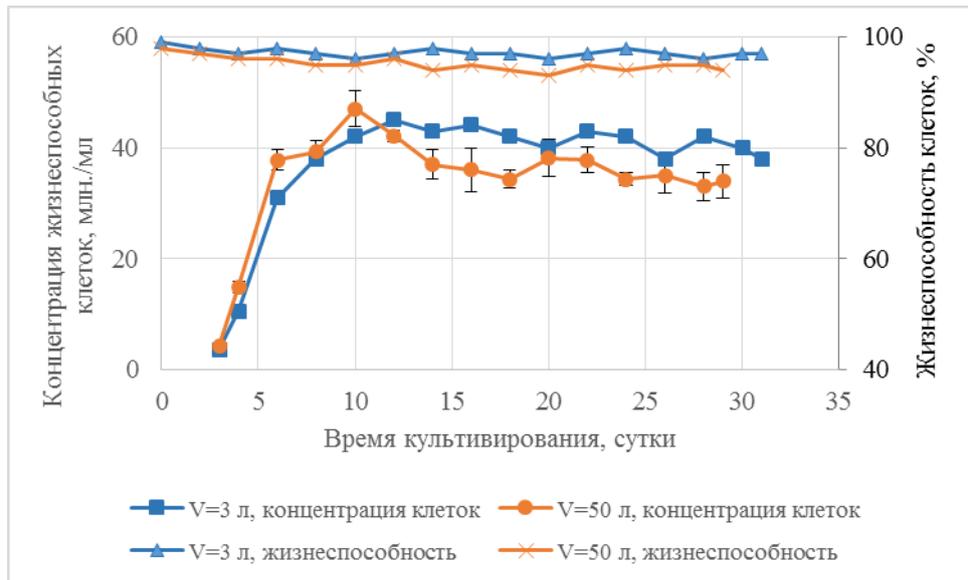


Рисунок 38 - Кривые роста и жизнеспособности клеток клона СНО 11А8 при культивировании в лабораторном и пилотном биореакторах (для процесса в объёме 50 литров  $n = 2$ , предел погрешностей обозначает размах)

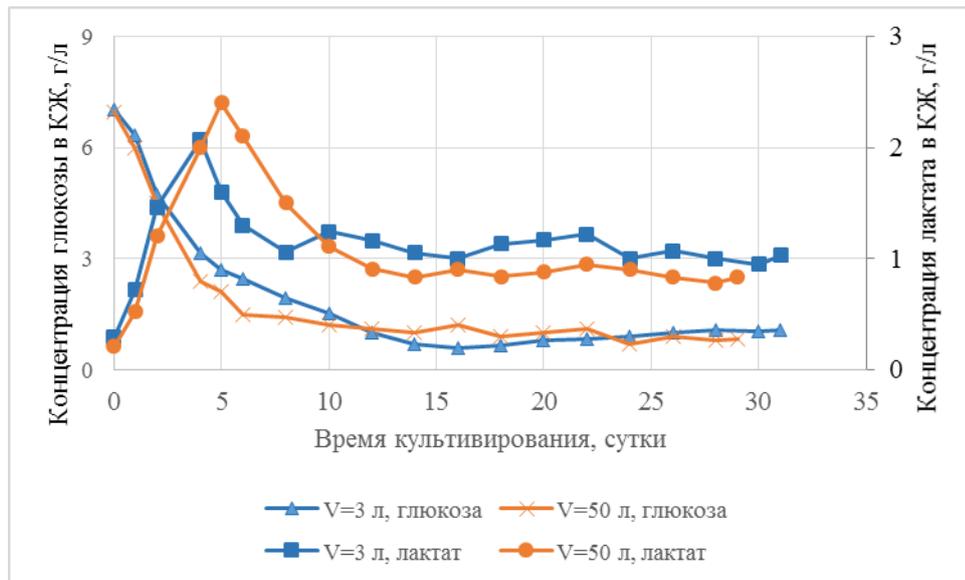


Рисунок 39 - Динамика изменения концентрации глюкозы и лактата в культуральной жидкости при культивировании клеток клона СНО 11А8 в лабораторном и пилотном биореакторах

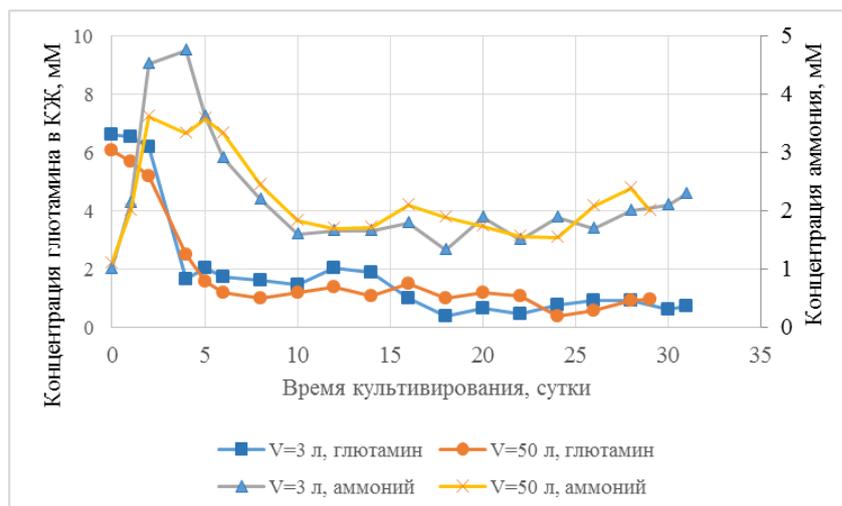


Рисунок 40 - Динамика изменения концентрации глутамина и аммония в культуральной жидкости при культивировании клеток клона СНО 11А8 в лабораторном и пилотном биореакторах

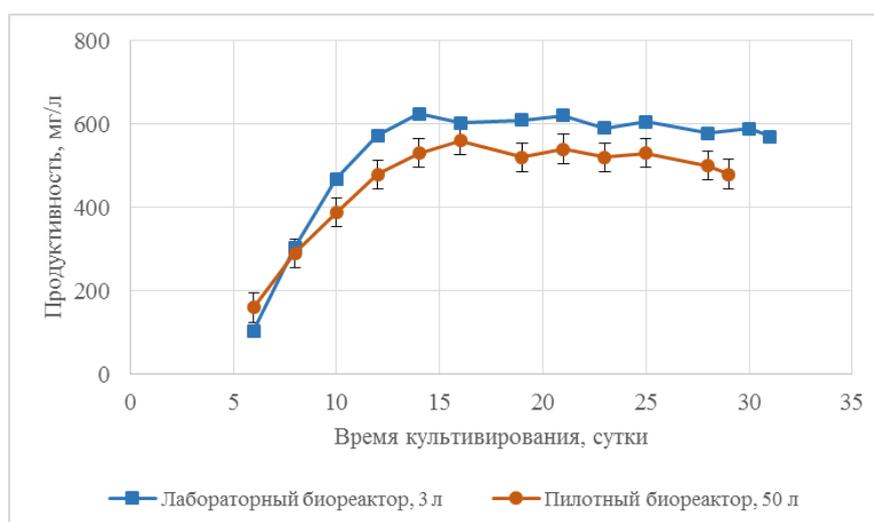


Рисунок 41 - Кривая продуктивности при культивировании клеток клона СНО 11А8 в лабораторном и пилотном биореакторах (для процесса в объёме 50 литров  $n = 2$ , предел погрешностей обозначает размах)

Из полученного в ходе масштабирования материала было проведено выделение целевого белка по разработанной методике, а также наработаны 4 серии фармацевтической субстанции, из которых получено 2 серии лекарственного препарата. Обе серии лекарственного препарата были проанализированы в соответствии с ФСП, в результате чего было показано полное соответствие заявленным параметрам качества.

2.11. Технологическая схема производства лекарственного препарата  
на основе моноклонального антитела GNR044

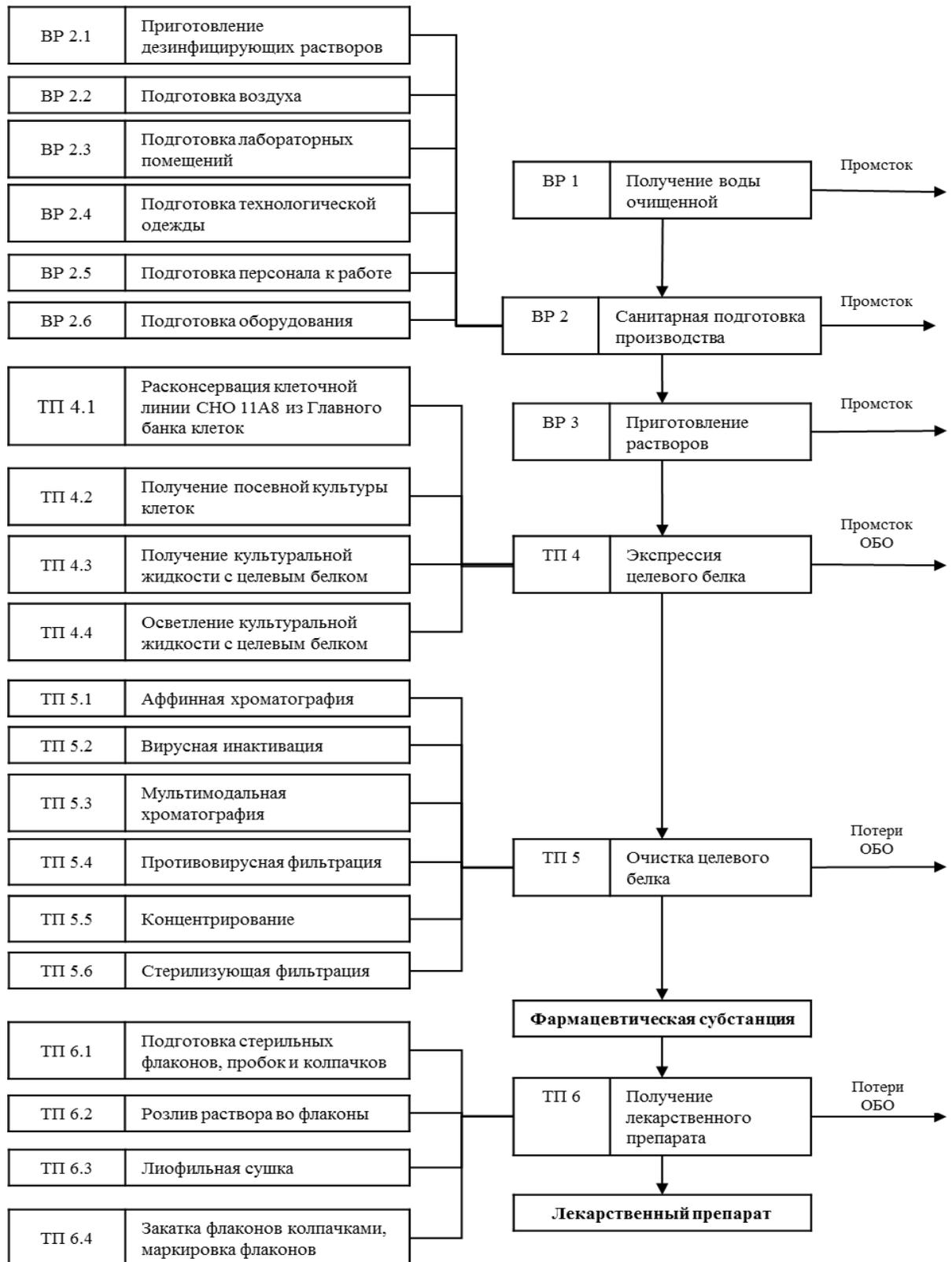


Рисунок 42 - Технологическая схема производства лекарственного препарата на основе моноклонального антитела GNR044

Разработанная пилотная технология производства лекарственного препарата на основе моноклонального антитела GNR044 состоит из следующих основных этапов:

1. Расконсервация клеточной линии CHO 11A8 из Главного банка клеток и культивирование культуры клеток в колбах Эрленмейера
2. Получение посевной культуры клеток в биореакторе волнового типа Flexsafe 10L
3. Культивирование продуцента в продукционном биореакторе SUB100 с выносной системой перфузии ATF6
  - 3.1. Накопление биомассы («разгон культуры»)
  - 3.2. Получение производственных сливов
  - 3.3. Непрерывное осветление суспензии клеток, отбираемой из биореактора, с помощью глубинной фильтрации
4. Выделение и очистка целевого белка с помощью аффинной и мультимодальной хроматографии
5. Противовирусная фильтрация субстанции целевого белка
6. Концентрирование и диафильтрация субстанции
7. Лиофилизация целевого белка и получение лекарственного препарата
8. Анализ полученного лекарственного препарата на соответствие ФСП

Процесс культивирования начинают с размораживания ампулы Главного банка клеток клона CHO 11A8. Размороженную суспензию клеток помещают в колбу Эрленмейера 125 мл с рабочим объёмом суспензии 20 мл, посевная концентрация клеток составляет  $0,5 \pm 0,1$  млн./мл. Клетки культивируют в шейкере-инкубаторе при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$  в газовой фазе инкубатора. Амплитуда вращения платформы инкубатора – 50 мм, частота вращения – 90-110 об/мин. Длительность культивирования клеток в колбе Эрленмейера 125 мл составляет 3 суток. Затем полученную культуру пересевают в 2 колбы Эрленмейера 1000 мл с рабочим объёмом суспензии 250 мл каждая, посевная концентрация клеток составляет  $0,3 \pm 0,05$

млн./мл. Культивирование проводится в тех же условиях, продолжительность пассажа составляет 3 суток.

На следующем этапе суспензию клеток из двух колб Эрленмейера стерильно переносят в биореактор волнового типа Flexsafe 10L (Sartorius) и доводят объём суспензии до 5 л. Посевная концентрация клеток в биореакторе составляет  $0,4 \pm 0,05$  млн./мл. Клетки культивируют при температуре  $37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$  в газовой фазе в течение 3 суток. Затем суспензию клеток стерильно переносят в производственный биореактор SUB100, содержащий 45 л питательной среды, нагретой до  $37^\circ\text{C}$  и уравновешенной газовой смесью воздух/ $\text{CO}_2$  в соотношении 95/5. рН питательной среды при засеве составляет  $6,9 \pm 0,1$ , посевная концентрация клеток –  $0,5 \pm 0,05$  млн./мл. Концентрация растворённого кислорода в культуральной жидкости поддерживается на уровне 40% от насыщения.

В производственном биореакторе культуру клеток в течение первых трёх суток культивируют в режиме батч. Через 72 часа включают проток питательной среды. В течение следующих 5 суток скорость протока увеличивают от 0 до  $0,75 \text{ сут}^{-1}$  (ускорение перфузии составляет  $0,15 \text{ сут}^{-2}$ ). При достижении скорости перфузии  $0,45 \text{ сут}^{-1}$  осуществляют снижение температуры до  $34^\circ\text{C}$  и начинают отбор суспензии клеток (блидинг) со скоростью  $0,1 \text{ сут}^{-1}$ . Перфузаты (культуральная жидкость, прошедшая через фильтр перфузионной системы ATF6) собирают начиная с девярых суток процесса культивирования. Их объединяют с осветлённой культуральной жидкостью, полученной в результате непрерывной фильтрации блидинга. Объединённый объём культуральной жидкости передают на стадию выделения и очистки целевого белка. Данная стадия описана в разделе «Материалы и методы». Кроме того, в случае наработки препарата на клинические испытания проводят вирусную очистку, включающую в себя вирусную инактивацию элюата белка после аффинной стадии (выдержка при низком рН) и противовирусную нанофильтрацию раствора целевого антитела после мультимодальной хроматографии. Мультимодальная хроматография

также является одной из ортогональных стадий вирусной очистки. Разработанная методика выделения и очистки GNR044 позволяет получать субстанцию целевого белка из культуральной жидкости перфузионного процесса с общим выходом около  $75\pm 5\%$ .

Полученная в результате предыдущих шагов фармацевтическая субстанция антитела GNR044 помещается в стерильные одноразовые мешки, в которых хранится при температуре  $2...8\text{ }^{\circ}\text{C}$  или минус  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до этапа производства лекарственного препарата. Получение лекарственного препарата в форме лиофилизата описано в разделе «Материалы и методы».

В табл. 24 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 исходя из предельной отпускной цены согласно Перечня ЖНВЛП 16806,56 руб./флакон [141], 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 24 - Техничко-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

### 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Целью настоящего исследования являлось создание технологии непрерывного суспензионного культивирования клеток *CHO*, продуцирующих моноклональное гуманизованное антитело GNR044, потенциальный биоаналог лекарственного средства *омализумаб*, и масштабирование этой технологии до опытно-промышленного уровня.

В качестве первого этапа разработки технологии была проведена аналитическая работа по определению критических показателей качества целевой молекулы и критических параметров процесса культивирования. Используя литературные данные и опыт предыдущих разработок, мы установили связи между критическими показателями качества и критическими параметрами процесса. Данная работа проводилась в соответствии с концепцией Quality by Design, позволяющей провести разработку наиболее эффективно, уделяя основное внимание наиболее рискованным аспектам будущей технологии и разрабатываемого продукта. QbD представляет собой системный подход к разработке лекарственных препаратов, основывающийся на надёжных научных данных и глубокой оценке рисков.

На основании проведённой оценки критичности параметров качества омализумаба, а также результатов анализа 4 серий оригинального 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 оригинального препарата. Для менее критичных показателей диапазон был расширен в соответствии со степенью критичности.

Отправной точкой оптимизации критических параметров процесса, влияющих на качество целевого белка, послужила реализация и анализ

базового процесса культивирования. Основные технологические параметры, используемые для базового процесса, были определены на основании предыдущего опыта разработки непрерывных процессов культивирования в МБЦ «Генериум».

Одним из необходимых шагов реализации базового процесса культивирования было обоснование состава питательной среды (базовая среда плюс подпитка) – фактора, во многом определяющего эффективность перфузионного культивирования. Скрининг базовых питательных сред не производился, в качестве базовой была выбрана питательная среда BalanCD CHO Growth A, зарекомендовавшая себя как высокоэффективная и стабильная базовая среда, демонстрирующая минимальную вариабельность между партиями, имеющая высокую стабильность при хранении даже в жидком виде, поддерживающая высокую скорость роста культуры клеток. Обоснование состава питательной среды сводилось к скринингу добавок, отобранных из ряда коммерчески доступных композиций, и определению оптимального соотношения среда/добавка. В ходе ряда экспериментов в режимах фэд-батч и хемостат была определена оптимальная добавка (BalanCD CHO Feed 3) и её концентрация в базовой среде (10%).

На следующем этапе разработки базового процесса необходимо было отработать начальную стадию культивирования, поскольку наши предшествующие наблюдения показывали, что особое внимание в ходе разработки перфузионного процесса должно быть уделено именно этапу накопления биомассы. В результате проведённых исследований было выявлено, что режим протока питательной среды на начальном этапе перфузионного процесса может существенно влиять на основные параметры роста и продуктивности культуры клеток CHO и свойства экспрессируемого белка.

Недостаточно быстрое увеличение скорости перфузии приводит к метаболическим перестроениям клетки, снижающим её пролиферативные характеристики, и, одновременно, увеличивающим удельную

продуктивность культуры. 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.

Слишком быстрое увеличение скорости перфузии поддерживает высокую удельную скорость роста культуры 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.

После разработки этапа накопления биомассы клеток были проведены эксперименты по оценке влияния непрерывного отбора клеточной суспензии из биореактора на стабилизацию роста клеток, уровень экспрессии и профиль качества целевого белка. Характерным элементом любого истинно непрерывного процесса является его стабилизация на определённом уровне ключевых показателей 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. Большинство исследователей сходятся во мнении, что вывод клеток из биореактора с помощью блидинга – необходимое условие установления *равновесного состояния* в ходе непрерывного культивирования. Отсутствие вывода клеточной суспензии, как правило, приводит к критическому лимитированию культуры по одному или нескольким незаменимым компонентам

питательной среды, дестабилизации и последующей терминации процесса культивирования. Наши исследования подтвердили эффективность непрерывного вывода клеток из биореактора для стабилизации процесса культивирования. Показано, что блидинг на уровне 0,1-0,2 сут<sup>-1</sup> позволяет достичь равновесного состояния клеток, экспрессирующих антитело GNR044, и увеличить продолжительность культивирования минимум до 30 суток. При этом меньшей скорости блидинга соответствует большая равновесная концентрация клеток и большая продуктивность процесса, что вполне сопоставимо с данными других исследователей. Также установлено, что блидинг на уровне 0,05 сут<sup>-1</sup> не позволяет добиться стабильного процесса. Определение скорости блидинга завершило этап обоснования базового процесса культивирования. Полученный в результате базового процесса целевой белок имел профиль качества, отличающийся от оригинального препарата по такому показателю, как изоформы с различным зарядом. В ходе оценки критичности показателей качества омализумаба было установлено, что кислые изоформы антитела могут оказывать негативное влияние на его безопасность и эффективность. Содержание кислых изоформ в оригинальном 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. По данным разработчика оригинальной молекулы, основной вклад в состав кислых изоформ омализумаба вносит дезамидирование остатков аспарагина.

Таким образом, следующим этапом разработки технологии культивирования была оптимизация профиля кислых изоформ антитела GNR044. Исследования велись как в периодическом, так и в непрерывном режимах. Проведённые эксперименты показали существенное влияние режима культивирования и отдельных технологических параметров на содержание кислых изоформ в разрабатываемом биоаналоге омализумаба. При периодическом культивировании снижение уровня pH и сокращение

времени процесса приводит к заметной убыли кислой фракции целевого белка. Однако при сокращении длительности культивирования страдают его экономические характеристики.

Данных недостатков удалось избежать при использовании перфузионного культивирования. Благодаря малому времени пребывания целевого белка в биореакторе в режиме перфузии возможно получать белок с низким содержанием кислых изоформ. Подбор скорости потока питательной среды позволил добиться содержания кислой фракции на уровне, имеющем высокую степень подобия с данным параметром в оригинальном препарате. Полученные результаты хорошо соотносятся с литературными данными, согласно которым непрерывные процессы позволяют получать существенно более низкий уровень кислых изоформ в экспрессируемых молекулах, а более высокий pH культуральной среды способствует увеличению содержания кислых изоформ целевого белка.

Параллельно с разработкой технологии культивирования клон-продуцента, разрабатывалась методика выделения и очистки антитела GNR044, а также получения фармацевтической субстанции и лекарственного препарата. Разработанная методика выделения и очистки GNR044 позволила получать субстанцию целевого белка, удовлетворяющую нормам спецификации, из культуральной жидкости разработанного перфузионного процесса с общим выходом около  $75\pm 5\%$ . Достигнутая эффективность очистки вполне согласуется с данными по эффективности очистки моноклональных антител в компаниях, являющихся лидерами фармацевтической индустрии США и Европы [71].

На следующем этапе разработки технологии происходило масштабирование процесса культивирования до пилотного уровня. Одной из самых серьёзных проблем при масштабировании процессов культивирования животных клеток является избыточное накопление в культуральной жидкости углекислого газа и влияние данного фактора на ростовые и продукционные характеристики культуры клеток. Стоит отметить, что

растворённый углекислый газ является одним из важнейших компонентов систем культивирования клеток млекопитающих. Для обоснованного выбора элементов газовой стратегии в ходе масштабирования разработанного технологического процесса в биореакторе SUB100 (HyClone) было необходимо установить, каковы допустимые пределы концентрации растворённого  $\text{CO}_2$  в культуральной среде и какова чувствительность культуры клеток к экстремальным значениям  $p\text{CO}_2$  на различных этапах процесса культивирования. В связи с этим одной из задач данной работы было моделирование неблагоприятных с точки зрения растворённого  $\text{CO}_2$  условий и оценка их влияния на культуру клеток CHO 11A8 в лабораторном масштабе. Было изучено поведение культуры как в периодическом, так и непрерывном режимах культивирования на различных этапах роста культуры.

Проведенное исследование показало, что культура клеток CHO 11A8 приобретает устойчивость к высокому  $p\text{CO}_2$  уже на поздней экспоненциальной стадии развития при периодическом культивировании, а в продукционной фазе перфузионного процесса 20%-ная концентрация  $\text{CO}_2$  практически не снижает жизнеспособности клеток и выхода целевого продукта. 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  $\text{CO}_2$ , 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. В целом, полученные результаты подтверждают описанную в работах других авторов важность мониторинга уровня  $p\text{CO}_2$  в культуральной жидкости и поддержания его в определённом диапазоне не только в ходе масштабирования процесса, но и во время лабораторных экспериментов.

Было 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 отмечено 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.

Результаты проведённых исследований использованы при написании заключительного отчёта о выполнении НИОКР от 03.04.2017 года, а также при разработке лабораторного и опытно-промышленного регламентов (ОПР №89761464-47-16) на производство фармацевтической субстанции моноклонального антитела GNR044, потенциального биоаналога омализумаба.

#### 4. ВЫВОДЫ

1. Разработан высокопроизводительный процесс непрерывного перфузионного культивирования клеточной линии CHO 11A8 минимальной продолжительностью 30 суток, позволяющий получать моноклональное антитело GNR044, потенциальный биоаналог омализумаба, с продуктивностью  $410 \pm 30$  мг очищенного белка с 1 л культуральной жидкости.

2. В рамках подхода Quality by Design идентифицированы критические показатели качества целевого белка и критические параметры процесса культивирования клона-продуцента. На основании изучения критичности показателей качества антитела GNR044 и анализа серий оригинального препарата определены целевые диапазоны показателей качества антитела GNR044.

3. Обоснована скорость протока питательной среды  $0,75 \text{ сут}^{-1}$ , позволяющая получать антитело GNR044 с содержанием кислых изоформ на уровне  $10,1 \pm 0,3\%$ , что соответствует профилю оригинального 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  $0,15 \text{ сут}^{-2}$ , позволяющий эффективно выводить клеточную культуру в фазу стационарного роста.

5. Обоснован режим непрерывного отбора клеточной суспензии (блидинга) со скоростью  $0,1 \text{ сут}^{-1}$ , 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 ATF6. 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 жёсткими 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 ОПР №89761464-47-16, на основании которого получены серии лекарственного препарата GNR044 для проведения клинических испытаний.

## 5. ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАУЧНЫХ 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 (ОПР №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.

4. Результаты проведённых исследований включены в общий технический документ, входящий в регистрационное досье препарата на основе моноклонального антитела GNR044.

## 6. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

Рекомендовать описанные технологические этапы и методологию исследования для разработки высокопродуктивных технологий производства биотехнологических лекарственных средств как медицинского, так и ветеринарного применения.

## 7. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ahn, W. S. Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells / W. S. Ahn, J. J. Jeon, Y. R. Jeong, S. J. Lee, S. K. Yoon // *Biotechnology and Bioengineering*. - 2008. - Vol. 101. - P. 1234-1244.
2. Altamirano, C. Decoupling cell growth and product formation in Chinese hamster ovary cells through metabolic control / C. Altamirano, J. J. Cairo, F. Godia // *Biotechnology and Bioengineering*. - 2001. - Vol. 76. - P. 351-360.
3. A-Mab: A Case Study in Bioprocess Development. CMC Biotech Working Group. 2009.
4. Backer, M. P. Large-scale production of monoclonal antibodies in suspension culture / M. P. Backer, L. S. Metzger, P. L. Slaber, K. L. Nevitt, G. B. Boder // *Biotechnology and Bioengineering*. - 1988. - Vol. 32. - P. 993–1000.
5. Banik, G. G. Partial and total cell retention in a filtration based homogeneous perfusion reactor / G. G. Banik, C. A. Heath // *Biotechnology Progress*. - 1995. - Vol. 11. - P. 584-588.
6. Becerra, S. Exploring the effect of mild hypothermia on CHO cell productivity / S. Becerra, J. Berrios, N. Osses, C. Altamirano // *Biochemical Engineering Journal*. - 2012. - Vol. 60. - P. 1-8.
7. Boguniewicz, M. Atopic dermatitis / M. Boguniewicz, D.Y.M. Leung // *Allergy Principles and Practice* [edited by E. Middleton, C.E. Reed, E.F. Ellis, N.F. Adkinson, J.W. Yunginger, W.W. Busse]. St. Louis: Mosby Year Book. - 1998. - P. 1123-1134
8. Brorson, K. Therapeutic monoclonal antibodies and consistent ends: terminal heterogeneity, detection, and impact on quality / K. Brorson, A. Jia // *Current Opinion in Biotechnology*. - 2014. - Vol. 30. - P. 140-146.

9. Bruhlmann, D. Tailoring recombinant protein quality by rational media design / M. Jordan, J. Hemberger, M. Sauer, M. Stettler, H. Broly // *Biotechnol. Prog.* - 2015. - Vol. 31, № 3. - P. 615-629.
10. Cacia, J. Isomerization of an aspartic acid residue in the complementarity-determining regions of a recombinant antibody to human IgE: identification and effect on binding affinity / J. Cacia, R. Keck, L. G. Presta, J. Frenz // *Biochemistry.* - 1996. - № 35. - P. 1897-1903.
11. Castilho, L. R. Continuous animal cell perfusion processes: the first step toward integrated continuous biomanufacturing / L. R. Castilho // *Continuous processing in pharmaceutical manufacturing* [edited by Subramanian G.]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. - 2015. - P. 115-154.
12. Castilho, L. R. Cell retention devices for suspended-cell perfusion cultures / L. R. Castilho, R. A. Medrondo // *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology.* - 2002. - Vol. 74. - P. 129-169.
13. Chuppa, S. Fermentor temperatures as a tool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells / S. Chuppa, Y. S. Tsai, S. Yoon, S. Shackelford, C. Rozales, R. Bhat, G. Tsay, C. Matanguihan, K. Konstantinov, D. Naveh // *Biotechnology and Bioengineering.* - 1997. - Vol. 55. - P. 328-338.
14. Clincke, M.F. Very high density of Chinese hamster ovary cells in perfusion by alternating tangential flow or tangential flow filtration in WAVE Bioreactor™. Part II: Applications for antibody production and cryopreservation / M.F. Clincke, C. Mölleryd, P.K. Samani, E. Lindskog, E. Fäldt, K. Walsh, V. Chotteau // *Biotechnology Progress.* - 2013. - Vol. 29. - P. 768–777.
15. Clincke, M.F. Very high density of CHO cells in perfusion by ATF or TFF in WAVE bioreactor™. Part I. Effect of the cell density on the process / M.F. Clincke, C. Mölleryd, Y. Zhang, E. Lindskog, K. Walsh, V. Chotteau // *Biotechnology Progress.* - 2013. - Vol. 29. - P. 754–767.

16. Crowley, J. Perfusion cell culture / J. Crowley, M. Wübben, J. M. Coco Martin // European Pat. 2540815. - 2013.
17. Dakshinamurthy, P. Charge variant analysis of proposed biosimilar to Trastuzumab / P. Dakshinamurthy, P. Mukunda, B.P. Kodaganti, B.R. Shenoy, B. Natarajan, A. Maliwalave, V. Halan, S. Murugesan, S. Maity // Biologicals. - 2017. - Vol. 46. - P. 46-56.
18. Dalm, M. Effect of Feed and Bleed Rate on Hybridoma Cells in an Acoustic Perfusion Bioreactor: Part I. Cell Density, Viability and Cell-Cycle Distribution / M. Dalm, S. Cuijten, W. van Grunsven, J. Tramper, J. Martens // Biotechnology and Bioengineering. - 2004. - Vol. 88. - P. 547-557.
19. de la Broise, D. Long-term perfusion culture of hybridoma: a “grow or die” cell cycle system / D. de la Broise, M. Noiseux, R. Lemieux, B. Massie // Biotechnology and Bioengineering. - 1991. - Vol. 38. - P. 781-787.
20. de Zengotita, V. M. Selected amino acids protect hybridoma and CHO cells from elevated carbon dioxide and osmolality / V. M. de Zengotita, L. R. Abston, A. E. Schmelzer, W. M. Miller // Biotechnology and Bioengineering. - 2002. - Vol. 78, № 7. - P. 741-752.
21. Derzi, M. Nonclinical evaluation of PF-06438179: A potential biosimilar to Remicade (infliximab) / M. Derzi, T. Johnson, A. Shoieb, H. Conlon, P. Sharpe, A. Saati, S. Koob, M. Bolt, L. Lorello, J. McNally, C. Kirchhoff, T. Smolarek, M. Leach // Advances in Therapy. - 2016. - Vol. 33. - P. 1964-1982.
22. Dowd, J. E. Optimization and control of perfusion cultures using a viable cell probe and cell specific perfusion rates / J. E. Dowd, A. Jubb, K. E. Kwok, J. M. Piret // Cytotechnology. - 2003. - Vol. 42. - P. 35-45.
23. Du, Y. Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies / Y. Du, A. Walsh, R. Ehrick, W. Xu, K. May, H. Liu // mAbs. - 2012. - Vol. 4, № 5. - P. 578-585.
24. Duarte, T. Metabolic responses of CHO cells to limitation of key amino acids / T. Duarte, N. Carinhas, L. Barreiro, M. Carrondo, P. Alves, A.

- Teixeira // *Biotechnology and Bioengineering*. - 2014. - Vol. 111, № 10. - P. 2095-2106.
25. Durocher, Y. Expression systems for therapeutic glycoprotein production / Y. Durocher, M. Butler // *Current Opinion in Biotechnology*. - 2009. - Vol. 20. - P. 700-707.
26. Duvar, S. Developing an upstream process for a monoclonal antibody including medium optimization / S. Duvar, V. Hecht, J. J. Finger, M. Gullans, H. Ziehr // *BMC Proceedings*. - Vol. 7 (Suppl. 6). - 2013. - P. 34.
27. Edelman, G.M. The covalent structure of an entire  $\gamma$ G immunoglobulin molecule / G.M. Edelman, B. A. Cunningham, W. E. Gall, P. D. Gottlieb, U. Rutishauser, M. J. Waxdal // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. - 1969. - Vol. 63. - P. 78-85.
28. Edwards, L. J. Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH / L. J. Edwards, D. Williams, D. Gardner // *Human Reproduction*. - 1998. - Vol. 13, № 12. - P. 3441-3448.
29. Eibl, R. Disposable bioreactors for plant liquid cultures at Litre-scale / R. Eibl, S. Wermer, D. Eibl // *Eng Life Sci*. - 2009. - Vol. 9, № 3. - P. 156-164.
30. Eon-Duval, A. Application of the Quality by Design approach to the drug substance manufacturing process of an Fc fusion protein: towards a global multi-step design space / A. Eon-Duval, P. Valax, T. Solacroup, H. Broly, R. Gleixner, C. Le Strat, J. Sutter // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. - 2012. - Vol. 101, № 10. - P. 3604-3618.
31. European Medicines Agency (EMA). Xolair: EPAR – Scientific Discussion. 2005. URL: [www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Scientific\\_Discussion/human/000606/WC500057295.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000606/WC500057295.pdf) (last accessed 30 March 2012).
32. European Public Assessment Report (EPAR) on Xolair // EMA/662471/2016. URL: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000606/human\\_med\\_001162.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000606/human_med_001162.jsp&mid=WC0b01ac058001d124)

33. FDA. PAT guidance for industry: A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Office of Regulatory Affairs (ORA), 2014.
34. Feng, Q. Application of “oxygen uptake rate-amino acids” associated mode in controlled-fed perfusion culture / Q. Feng, L. Mi, L. Li, R. Liu, L. Xie, H. Tang, Z. Chen // *Journal of Biotechnology*. - 2006. - Vol. 122. - P. 422-430.
35. Ferrara, C. The carbohydrate at FcγRIIIa Asn-162. An element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms / C. Ferrara, F. Stuart, P. Sonderrmann, P. Brünker, P. Umana // *Journal of Biological Chemistry*. - 2006. - Vol. 281. - P. 5032–5036.
36. Follstad, B. D. Mammalian cell culture / B. D. Follstad, R. E. McCoy, A. E. Morris // US Pat. 2014/0255993 A1. 2014.
37. Furth, A. J. Methods for assaying nonenzymatic glycosylation // *Analytical Biochemistry*. - 1988. - Vol. 175. - P. 347-360.
38. Ganz, M. B. Arginine vasopressin enhances  $\text{pH}_i$  regulation in the presence of  $\text{HCO}_3^-$  by stimulating three acid-base transport systems / M.B. Ganz, G. Boyarski, R. B. Sterzel, W. F. Boron // *Nature*. - 1989. - Vol. 337. - P. 648-651.
39. Gazzano-Santoro, H. A non-radioactive complement-dependent cytotoxicity assay for anti-CD20 monoclonal antibody / H. A. Gazzano-Santoro, P. Ralph, T. C. Ryskamp, A. B. Chen, V. R. Mukku // *Journal of Immunological Methods*. - 1997. - Vol. 202, № 2. - P. 163-171.
40. Geiger, T. Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation / T. Geiger, S. Clark // *The Journal of Biological Chemistry*. - 1987. - № 262. - P. 785-794.
41. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2017 / Global Initiative for Asthma. 2017. URL: <http://ginasthma.org/2017-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>

42. Goldman, M. H. Monitoring proteolysis of recombinant interferon- $\gamma$  during batch culture of Chinese hamster ovary cells / M. H. Goldman, D. C. James, A. P. Ison, A. T. Bull // *Cytotechnology*. - 1997. - Vol. 23. - P. 103-111.
43. Gottschalk U. Biomanufacturing: time for change? // *Pharmaceutical Bioprocessing*. - 2013. - Vol. 1. - P. 7-9.
44. Gould, H. J. IgE in allergy and asthma today / H. J. Gould, B. J. Sutton // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. - Vol. 8, № 3. - P. 205–217
45. Gray, D. R. CO<sub>2</sub> in large-scale and high-density CHO cell perfusion culture / D. R. Gray, S. Chen, W. Howarth, D. Inlow, B. L. Maiorella // *Cytotechnology*. - 1996. - Vol. 22. - P. 65-78.
46. Gupta S. K. Implementation of CQA (Critical Quality Attributes) based approach for development of biosimilars / S. K. Gupta // *Continuous processing in pharmaceutical manufacturing* [edited by Subramanian G.]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. - 2015. - P. 357-383.
47. Hacker, D. L. 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells – where do we go from here? / D. L. Hacker, M. De Jesus, F. M. Wurm // *Biotechnology Advances*. - 2009. - Vol. 27. - P. 1023–1027.
48. Haigney S. QbD and PAT in upstream and downstream processing // *BioPharm Int.* - 2013. - Vol. 26, № 7. - P. 28-37.
49. Hamm, M. Characterization of N-Linked Glycosylation in a Monoclonal Antibody Produced in NS0 Cells Using Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection / M. Hamm, Y. Wang, R. Rustandi // *Pharmaceuticals (Basel)*. - 2013. - Vol. 6, № 3. - P. 393-406.
50. Harbour, C. pH control options for hybridoma cultures / C. Harbour, K. S. Low, C. P. Marquis, J. P. Barford // *Biotechnology Techniques*. - 1989. - Vol. 3. - P. 73-78.
51. Harris R. J. Analytical characterization of monoclonal antibodies: linking structure to function / R. J. Harris, E. T. Chin, F. Macchi, R. G. Keck, B.-J. Shyong, V. T. Ling, A. J. Cordoba, M. Marian, D. Sinclair, J. E. Battersby, A. J.S. Jones // *Current Trends in Monoclonal Antibody Development and*

- Manufacturing [edited by S. J. Shire, W. Gombotz, K. Bechtold-Peters, J. Andya]. - New York: Springer. - 2010. - P. 193-205.
52. Harris R. J. Processing of C-terminal lysine and arginine residues of proteins isolated from mammalian cell culture // *Journal of Chromatography A*. - 1995. - Vol. 705, № 1. - P. 129-134.
53. Hiller, G. W. Cell retention-chemostat studies of hybridoma cells-analysis of hybridoma growth and metabolism in continuous suspension culture on serum-free medium / G. W. Hiller, D. S. Clark, H. W. Blanch // *Biotechnology and Bioengineering*. - 1993. - Vol. 42. - P. 185-195.
54. Hodoniczky, J. Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc *N*-glycan remodeling *in vitro* / J. Hodoniczky, Y. Z. Zheng, D. C. James // *Biotechnology Progress*. - 2005. - Vol. 21. - P. 1644-1652.
55. Holgate S. T. New strategies with anti-IgE in allergic diseases // *World Allergy Organization Journal*. - 2014. - Vol. 7, № 1. - p. 17.
56. Hong, J. K. Growth factor withdrawal in combination with sodium butyrate addition extends culture longevity and enhances antibody production in CHO cells / J. K. Hong, G. M. Lee, S. K. Yoon // *Journal of Biotechnology*. - 2011. - Vol. 155. - P. 225–231.
57. Hossler, P. Optimal and Consistent Protein Glycosylation in Mammalian Cell Culture / P. Hossler, S. F. Khattak, Z. J. Li // *Glycobiology*. - 2009. - Vol. 19. - № 9. - P. 936-949.
58. Hossler, P. Cell culture media supplementation of bioflavonoids for the targeted reduction of acidic species charge variants on recombinant therapeutic proteins / P. Hossler, M. Wang, S. McDermott, C. Racicot, K. Chemfe, Y. Zhang, C. Chumsae, A. Manuilov // *Biotechnol. Prog.* - 2015. - Vol. 31, № 4. - P. 1039-1052.
59. [http://www.worldallergy.org/UserFiles/file/WAO-White-Book-on-Allergy\\_web.pdf](http://www.worldallergy.org/UserFiles/file/WAO-White-Book-on-Allergy_web.pdf)
60. Hu, W.S. Large-scale mammalian cell culture / W.S. Hu, J. G. Aunins // *Current Opinion in Biotechnology*. - 1997. - Vol. 8. - P. 148–153.

61. Huang, L. Impact of variable domain glycosylation on antibody clearance: an LC/MS characterization / L. Huang, S. Biolsi, K. R. Bales, U. Kuchibhotla // *Analytical Biochemistry*. - 2006. - Vol. 249. - P. 197–207.
62. Ibarra, N. Modulation of cell cycle for enhancement of antibody productivity in perfusion culture of NS0 cells / N. Ibarra, S. Watanabe, J. X. Bi, J. Shuttleworth, M. Al-Rubeai // *Biotechnology Progress*. - 2003. - Vol. 19. - P. 224-228.
63. ICH. Guidance for the industry, Q8 (R2) Pharmaceutical development. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center Biologics Evaluation and Research (CBER), Revision 2, 2009. P. 1-25.
64. Itagaki, A. Tes and HEPES buffers in mammalian cell cultures and viral studies: problem of carbon dioxide requirement / A. Itagaki, G. Kimura // *Experimental Cell Research*. - 1974. - Vol. 83, № 2. - P. 351-361.
65. Jacquemart, R. A single-use strategy to enable manufacturing of affordable biologics / R. Jacquemart, M. Vandersluis, M. Zhao, K. Sukhija, N. Sidhu, J. Stout // *Computational and structural biotechnology journal*. - 2016. - Vol. 14. - P. 309-318.
66. Jayapal, K. P. Recombinant protein therapeutics from CHO cells – 20 years and counting / K.P. Jayapal, K. F. Wlaschin, W. S. Hu, M. G. Yap // *Chemical Engineering Progress*. - 2007. - Vol. 103. - P. 40–47.
67. Jensen-Jarolim, E. Pollen allergies in humans and their dogs, cats and horses: differences and similarities / E. Jensen-Jarolim, L. Einhorn, I. Herrman, J. G. Thalhammer, L. Panakova // *Clinical and Translational Allergy*. - 2015. - Vol. 5:15. - P. 1-9
68. Johansson, S. G. O. Omalizumab and the immune system: an overview of preclinical and clinical data / S. G. O. Johansson, T. Haahtela, P. M. O’Byrne // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* - 2002. - Vol. 89, № 2. - P. 132–138.
69. Jones, A. J. Selective clearance of glycoforms of a complex glycoprotein pharmaceutical caused by terminal N-acetylglucosamine is similar in

- humans and cynomolgus monkeys / A. J. Jones, D. I. Papac, E. H. Chin, R. Keck, S. A. Baughman, Y. S. Lin, J. Kneer, J. E. Battersby // *Glycobiology*. - 2007. - Vol. 17. - P. 529–540.
70. Junghans, R. P. The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor / R. P. Junghans, C. L. Andersen // *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. - 1996. - Vol. 93. - P. 5512–5516.
71. Kelley B. Very large scale monoclonal antibody purification: the case for conventional unit operations // *Biotechnology Progress*. - 2007. - Vol 23, № 5. - P. 995-1008.
72. Khawli, L. A. Charge variants in IgG1. Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats / L. A. Khawli, S. Goswami, R. Hutchinson, Z. W. Kwong, J. Yang, X. Wang, Z. Yao, A. Sreedhara, T. Cano, D. Tesar, I. Nijem, D. E. Allison, P. Y. Wong, Y.-H. Kao, C. Quan, A. Joshi, R. J. Harris, P. Motchnik // *mAbs*. - 2010. - Vol. 2, № 6. - P. 613-624.
73. Kilberg M. S. System A-mediated amino acid transport: metabolic control at the plasma membrane // *Trends in Biochemical Sciences*. - 1986. - Vol. 11, № 4. - P. 183-186.
74. Kilberg, M. S. Recent advances in mammalian amino acid transport / M. S. Kilberg, B. R. Stevens, D. A. Novak // *Annual Review of Nutrition*. - 1993. - Vol. 13, № 1. - P. 137-165.
75. Kim, J. Y. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential / J. Y. Kim, Y.-G. Kim, G. M. Lee // *Applied Microbiology and Biotechnology*. - 2012. - Vol. 93. - P. 917-930.
76. Kim, J.-S. High-level scuPA production by butyrate-treated serum-free culture of recombinant CHO cell line / J.-S. Kim, B.-C. Ahn, B.-P. Lim, Y.D. Choi, E.-C. Jo // *Biotechnology Progress*. - 2004. - Vol. 20. - P. 1788–1796.

77. Kimura, R. Effects of elevated pCO<sub>2</sub> and/or osmolality on the growth and recombinant tPA production of CHO cells / R. Kimura, W. M. Miller // *Biotechnology and Bioengineering*. - 1996. - Vol. 52. - P. 152-160.
78. Kishishita, S. Effect of temperature shift on levels of acidic charge variants in IgG monoclonal antibodies in Chinese hamster ovary cell culture / S. Kishishita, T. Nishikawa, Y. Shinoda, H. Nagashima, H. Okamoto, S. Takuma, H. Aoyagi // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. - 2015. - Vol. 119, № 6. - P. 700-705.
79. Klausning, S. Bioreactor cultivation of CHO DP-12 cells under sodium butyrate treatment: comparative transcriptome analysis with CHO cDNA microarrays / S. Klausning, O. Krämer, T. Noll // *BMC Proceedings*. - 2013. - Vol. 5 (Suppl. 8). - P. 98.
80. Konstantinov, K. The “Push-to-Low” approach for optimization of high-density perfusion cultures of animal cells / K. Konstantinov, C. Goudar, M. Ng. Meneses, J. Thrift, S. Chuppa, C. Matanguihan, J. Michaels, D. Naveh // *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. - 2006. - Vol. 101. - P. 75-98.
81. Krah, E.R. Lawton R. Methods and composition for inhibiting binding of IgE to high affinity receptor (USA, IDEXX Laboratories, Inc). Patent №7,931,898, B2. 2011
82. Krapf, R. Regulation of cell pH by ambient bicarbonate, carbon dioxide tension and pH in the rabbit proximal convoluted tubule / R. Krapf, C. A. Berry, R. J. Alpern, F. C. Jr. Rector // *Journal of Clinical Investigation*. - 1988. - Vol. 81. - P. 381-389.
83. Kumar, N. Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture / N. Kumar, P. Gammell, M. Clynes // *Cytotechnology*. - 2007. - Vol. 53. - P. 33–46
84. Lapolla, A. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry, enzymatic digestion, and molecular modeling in the study of nonenzymatic glycation of IgG / A. Lapolla, D. Fedele, M. Garbeglio, L. Martano, R.

- Tonani, R. Seaglia, D. Favretto, M. A. Fedrigo, P. Traldi // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. - 2000. - Vol. 11. - P. 153-159.
85. Larché, M. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy / M. Larché, C. A. Akdis, R. Valenta // *Nat. Rev. Immunol.* - 2006. - Vol. 6, № 10. - P. 761–771.
86. Lee, S.-Y. Effect of process change from perfusion to fed-batch on product comparability for biosimilar monoclonal antibody / S.-Y. Lee, Y.-B. Kwon, J.-M. Cho, K.-H. Park, S.-J. Chang // *Process Biochemistry*. - 2012. - Vol. 47. - P. 1411-1418.
87. Li, F. Cell culture processes for monoclonal antibody production / F. Li, N. Vijayasankaran, A. Shen, R. Kiss, A. Amanullah // *mAbs*. - 2010. - Vol. 2, № 5. - P. 466-477.
88. Liu, H. Heterogeneity of monoclonal antibodies / H. Liu, G. Gaza-Bulseco, D. Faldu, C. Chumsae, J. Sun // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. - 2008. - Vol. 97, № 7. - P. 2426-2447.
89. Liu, H. Impact of cell culture on recombinant monoclonal antibody product heterogeneity / H. Liu, C. Nowak, M. Shao, G. Ponniah, A. Neill // *Biotechnol. Prog.* - 2016. - Vol. 32, № 5. - P. 1103-1112.
90. Marx N. Evaluating of scaling parameters toward an improved process development strategy for CHO cell perfusion cultures-step-wise scale-up from 15 mL to 5 L: theses on the Master of Science degree in Pharmaceutical Biotechnology / Hamburg University of Applied Sciences. Copenhagen. - 2015. - 96 p.
91. McCamish, M. The state of the art in the development of biosimilars / M. McCamish, G. Woollett // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. - 2012. - Vol. 91, № 3. - P. 405-417.
92. Medronho R. A. Solid–liquid separation / R. A. Medronho // *Isolation and Purification of Proteins* [edited by B. Mattiasson and R. Hatti-Kaul]. New York: Marcel Dekker. - 2003. - P. 131–190.
93. Mercille, S. Filtration-based perfusion of hybridoma culture in protein-free medium: reduction of membrane fouling by medium supplementation with

- DNase I / S. Mercille, M. Johnson, R. Lemieux, B. Massie // *Biotechnology and Bioengineering*. - 1994. - Vol. 43. - P. 833–846.
94. Meuwly, F. Optimization of the medium perfusion rate in a packed-bed bioreactor charged with CHO cells / F. Meuwly, U. von Stockar, A. Kadouri // *Cytotechnology*. - 2004. - Vol. 46, № 1. - P. 37-47.
95. Meuwly, F. Conversion of a CHO cell culture process from perfusion to fed-batch technology without altering product quality / F. Meuwly, U. Weber, T. Ziegler, A. Gervais, R. Mastrangeli, C. Crisci, M. Rossi, A. Bernard, U. von Stockar, A. Kadouri // *Journal of Biotechnology*. - 2006. - Vol. 123. - P. 106-116.
96. Millward, T. A. Effect of constant and variable domain glycosylation on pharmacokinetics of therapeutic antibodies in mice / T. A. Millward, M. Heitzmann, K. Bill, U. Längle, P. Schumacher, K. Forrer // *Biologicals*. - 2007. - Vol. 36. - P. 41–47.
97. Mostafa, S. S. Strategies for improved dCO<sub>2</sub> removal in large-scale fed-batch cultures / S. S. Mostafa, X. Gu // *Biotechnology Progress*. - 2003. - Vol. 19, № 1. - P. 45-51.
98. Munzert, E. Sialidase activity in culture fluid of Chinese hamster ovary cells during batch culture and its effect on recombinant human antithrombin III integrity / E. Munzert, J. Muething, H. Buentemeyer, J. Lehmann // *Biotechnology Progress*. - 1996. - Vol. 12. - P. 559-563.
99. Okudaira H. Why atopic diseases prevail in developed countries // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. - 1998. - Vol. 10. - P. 110-114
100. Oliveira, J. E. Influence of a reduced CO<sub>2</sub> environment on the secretion yield, potency and N-glycan structures of recombinant thyrotropin from CHO cells / J. E. Oliveira, R. Damiani, K. Vorauer-Uhl, P. Bartolini, M. T. Ribela // *Molecular Biotechnology*. - 2008. - Vol. 39. - P. 159-166.
101. Onken, U. Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes / U. Onken, E. Liefke // *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. - 1989. - Vol. 40. - P. 137-169.

102. Ozturk S.S. Engineering Challenges in High Density Cell Culture Systems // *Cytotechnology*. - 1996. - Vol. 22. - P. 3-16
103. Ozturk S.S. Optimization of High Cell Density Perfusion Bioreactors / S. S. Ozturk // *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies* [edited by S.S. Ozturk, W.S. Hu]. New York: Taylor & Francis. - 2006. - P. 387-416.
104. Rathore, A. Quality by design for biopharmaceuticals / A. Rathore, H. Winkle // *Nat. Biotechnol.* - 2009. - № 27. - P. 26-34.
105. Reedy, L.M. Miller W.H., Willemsse T. Allergic Skin Diseases of Dog and Cat. 2<sup>nd</sup> edition. London: Saunders. 1997. P. 33-44
106. Rodriguez, J. High productivity of human recombinant beta-interferon from a low-temperature perfusion culture / J. Rodriguez, M. Spearman, T. Tharmalingam, K. Sunley, C. Lodewyks, N. Huzel, M. Butler // *Journal of Biotechnology*. - 2010. - Vol. 150. - P. 509-518.
107. Schiestl, M. Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals / M. Schiestl, T. Stanger, C. Torella, T. Cepeljnik, H. Toll, R. Grau // *Nature Biotechnology*. - 2011. - Vol. 29, № 4. - P. 310-312.
108. Scott, D.W. Miller W.H., Griffin C.E. *Small Animal Dermatology*. 6<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Saunders. 2001. P. 574-601
109. Sekhon, B.S. Biosimilars: an overview /B. S. Sekhon, V. Saluja // *Biosimilars*. - 2011. - № 1. - P. 1-11.
110. Shevitz J. Fluid filtration system // US Pat. 6544788 B2. 2003.
111. Shinkawa, T. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex type oligosaccharides shows the critical role for enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity / T. Shinkawa, K. Nakamura, N. Yamane, E. Shoji-Hosaka, Y. Kanda, M. Sakurada, K. Uchida, H. Anazawa, M. Sato, M. Yamasaki // *Journal of Biological Chemistry*. - 2003. - Vol. 278. - P. 3466–3473.

112. Sonderman, P. Mediation and modulation of antibody function / P. Sonderman, V. Osthuizen // *Biochemical Society Transactions*. - 2002. - Vol. 30. - P. 481-486.
113. Subramanian, K. Cell culture methods to reduce acidic species / K. Subramanian, X. Zeng, D.D. Dong, W.C. Lim, K.A. Gifford // *Pat. US20130344084A1*. 2013.
114. Tao, M.-H. Studies of aglycosylated chimeric mouse–human IgG / M.-H. Tao, S. L. Morrison // *Journal of Immunology*. - 1989. - Vol. 143. - P. 2595–2601.
115. Thorens, B. Chloroquine and ammonium chloride prevent terminal glycosylation of immunoglobulins in plasma cells without affecting secretion / B. Thorens, P. Vassali // *Nature*. - 1986. - Vol. 321. - P. 618-620.
116. Trampler, F. Acoustic cell filter for high density perfusion culture of hybridoma cells / F. Trampler, S. A. Sonderhoff, P. W. S. Pui, D. G. Kilburn, J. M. Piret // *Biotechnology*. - 1994. - Vol. 12. - P. 281–284.
117. Tsiftoglou, A.S. Development and regulation of biosimilars: current status and future challenges / A. S. Tsiftoglou, S. Ruiz, C.K. Schneider // *BioDrugs*. - 2013. - Vol. 27, № 3. - P. 203-211.
118. van Beers, M.M.C. Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes / M.M.C. van Beers, M. Bardor // *Biotechnology Journal*. - 2012. - Vol. 7, № 12. - P. 1473-1484.
119. Vergara, M. Simultaneous environmental manipulations in semi-perfusion cultures of CHO cells producing rh-tPA / M. Vergara, S. Becerra, A. Díaz-Barrera, J. Berrios, C. Altamirano // *Electronic Journal of Biotechnology*. - 2012. - Vol. 15, № 6. - doi: 10.2225/vol15-issue6-fulltext-2.
120. Vermasvuori, R. Economic comparison of diagnostic antibody production in perfusion stirred tank and in hollowfiber bioreactor processes / R. Vermasvuori, M. Hurme // *Biotechnology Progress*. - 2011. - Vol. 27. - P. 1588–1598.
121. Voisard, D. Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells / D. Voisard, F.

- Meuwly, P. A. Ruffieux, G. Baer, A. Kadouri // *Biotechnology and Bioengineering*. - 2003. - Vol. 82. - P. 751-765.
122. Wakankar, A.A. Aspartate isomerization in the complementarity-determining regions of two closely related monoclonal antibodies / A. A. Wakankar, R.T. Borchardt, C. Eigenbrot, S. Shia, Y.J. Wang, S. Shire, J.L. Liu // *Biochemistry*. - 2007. - № 46. - P. 1534-1544.
123. Wang, W. Antibody structure, instability, and formulation / W. Wang, S. Singh, D. Zeng, K. King, S. Nema // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. - 2007. - Vol. 96, № 1. - sP. 1-26.
124. WAO White book on allergy / edited by R. Pawankar, G. W. Canonica, S. T. Holgate, R. F. Lockey; World allergy organization. 2011. 220 p. URL:
125. Warikoo, V. Integrated continuous production of recombinant therapeutic proteins / V. Warikoo, R. Godawat, K. Brower // *Biotechnology and Bioengineering*. - 2012. - Vol. 109, № 12. - P. 3018-3029.
126. Warikoo, V. Integrated continuous production of recombinant therapeutic proteins / V. Warikoo, R. Godawat, K. Brower, S. Jain, D. Cummings, E. Simons, T. Johnson, J. Walther, M. Yu, B. Wright, J. McLarty, K. P. Karey, C. Hwang, W. Zhou, F. Riske, K. Konstantinov // *Biotechnology and Bioengineering*. - 2012. - Vol. 109. - P. 3018–3029.
127. Wiebe, M.E. A multifaceted approach to assure that recombinant tPA is free of adventitious virus / M. E. Wiebe, B. D. Bowen, J. M. Piret // *Advances in animal cell biology and technology*. - London: Butterworth-Heinemann. - 1989. - P. 68–71.
128. Woodside, S. M. Mammalian cell retention devices for stirred perfusion bioreactors // *Cytotechnology*. - 1998. - Vol. 28. - P. 129-169.
129. Wu, L. C. The production and regulation of IgE by the immune system / L. C. Wu, A. A. Zarrin // *Nat. Rev. Immunol.* - 2014. - Vol. 14, № 4. - P. 247–259.
130. Xie, L. Fed-batch cultivation of mammalian cells for the production of recombinant proteins / L. Xie, W. Zhou // *Cell Culture Technology for*

- Pharmaceutical and Cell-Based Therapies [edited by S.S. Ozturk, W.S. Hu].  
New York: Taylor & Francis. - 2006. - P. 349-386.
131. Xie, P. Elucidating the effects of pH shift on IgG1 monoclonal antibody acidic charge variant levels in Chinese hamster ovary cell cultures / H. Niu, X. Chen, X. Zhang, S. Miao, X. Deng, X. Liu, W.-S. Tan, Y. Zhou, L. Fan // *Applied Microbiology and Biotechnology*. - 2016. - Vol. 100, № 24. - P. 10343-10353.
132. Xing, Z. Scale-up analysis for a CHO cell culture process in large-scale bioreactors / Z. Xing, B. Kenty, Z. J. Li, S. S. Lee // *Biotechnology and Bioengineering*. - 2009. - Vol. 103, № 4. - P. 733-746.
133. Yang, J. D. Achievement of high cell density and high antibody productivity by a controlled-fed perfusion bioreactor process / J. D. Yang, Y. Angelillo, M. Chaudhry, C. Goldenberg, D. M. Goldenberg // *Biotechnology and Bioengineering*. - 2000. - Vol. 69. - P. 74–82.
134. Yoon, S. K. Enhancement of recombinant erythropoietin production in CHO cells in an incubator without CO<sub>2</sub> addition / S. K. Yoon, Y. Ahn, K. Han // *Cytotechnology*. - 2001. - Vol. 37. - P. 119-132.
135. Yu, M. Production, characterization and pharmacokinetic properties of antibodies with N-linked Mannose-5 glycans / M. Yu, D. Brown, C. Reed, S. Chung, J. Lutman, E. Stefanich, A. Wong, J. P. Stephan, R. Bayer // *mAbs*. - 2012. - Vol. 4, № 4. - P. 475-487.
136. Zagari, F. Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity / F. Zagari, M. Jordan, M. Stettler, H. Broly, F. M. Wurm // *New Biotechnology*. - 2013. - Vol. 30, № 2. - P. 238–245.
137. Zhao, Y.-Y. Charge variants of an avastin biosimilar isolation, characterization, in vitro properties and pharmacokinetics in rat / Y.-Y. Zhao, N. Wang, W.-H. Liu, W.-J. Tao, L.-L. Liu, Z.-D. Shen // *PLoS One*. - 2016. - Vol. 11, № 3. - P. 1-13.
138. Zhu, M. M. Effects of elevated pCO<sub>2</sub> and osmolality on growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: a case study / M. M.

- Zhu, A. Goyal, D. L. Rank, S. K. Gupta, T.V. Boom, S. S. Lee // *Biotechnology Progress*. - 2005. - Vol. 21. - P. 70-77.
139. Александров, А.В. Внедрение концепции Quality-by-Design при разработке дженериков // Обеспечение качества лекарственных средств-2012: доклад на международной конференции, 18-21 июня 2012 г. - Судак, 2012. -URL: <http://www.vialek.ru/press/performances/679/>
140. Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии: учебники и учебные пособия для студентов высших учебных заведений. М.: КолосС. - 2004. - 296 с.
141. Ксолар. Инструкция по применению. URL: [https://www.rlsnet.ru/tn\\_index\\_id\\_36922.html](https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_36922.html)
142. Ненашева Н.М. Омализумаб в терапии тяжёлой бронхиальной астмы // Эффективная фармакотерапия. - 2014. - №29. - С. 24-34.
143. Федеральная целевая программа «Бронхиальная астма» (2011-2015 годы). – 2009.
144. Чучалин А. Г. Новые перспективы в терапии бронхиальной астмы // Пульмонология. - 2011. - №4. - С. 5-12.

## 8. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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. Алимova // 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. Смоллов // 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. Искакова // Биофармацевтический журнал. - 2017. - Т. 9, № 5. - С. 11-16.
4. Тюпа, Д.В. Влияние экстремальных концентраций растворённого CO<sub>2</sub> 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.

## 9. ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение А. Опытно-промышленный регламент на производство фармацевтической субстанции моноклонального антитела GNR044, потенциального биоаналога омализумаба

**АО «ГЕНЕРИУМ»**

РАЗДЕЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ГОТОВОГО ПРОДУКТА  
ПРОИЗВОДСТВА

1.1 Назначение препарата и его применение  
1.2 Способ применения и дозы

Конфиденциальность гарантируется  
получателем информации  
Для служебного пользования Экз. № 1

РАЗДЕЛ 2. ХИМИЧЕСКАЯ СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА  
РАЗДЕЛ 3. ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА  
РАЗДЕЛ 4. АНАЛИТИЧЕСКАЯ СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА  
СТРАНИЦА ДВА ИЗ ДВУХ ДОБА  
4.1 Лаборатория исходных  
4.2 Спецификация исходных

**УТВЕРЖДАЮ**  
Исполнительный директор  
АО «ГЕНЕРИУМ»  
И.В. Мягих  
09 2016г.

**ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫЙ РЕГЛАМЕНТ**  
на производство  
**Омализумаб**  
Омализумаб  
Субстанция-раствор  
**ОПР 89761464-47-16**

Срок действия регламента  
до «19» 09 2019г.

**СОГЛАСОВАНО**  
Заместитель генерального директора  
АО «ГЕНЕРИУМ»  
В.Т. Пантюшенко  
«07» 09 2016г.

**СОГЛАСОВАНО**  
Заместитель генерального директора  
по качеству АО «ГЕНЕРИУМ»  
В.П. Крауклис  
«08» 09 2016г.

п. Вольгинский

Приложение Б. Уведомление о приёме и регистрации заявки на патент  
на изобретение «Способ получения моноклональных антител  
терапевтического назначения с помощью непрерывного культивирования  
клеток СНО»

Форма № 94 ИЗ, ПМ, ПО-2016

Федеральная служба по интеллектуальной собственности  
Федеральное государственное бюджетное учреждение

 «Федеральный институт промышленной собственности»  
(ФИПС)

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993

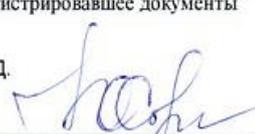
Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

## УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЁМЕ И РЕГИСТРАЦИИ ЗАЯВКИ

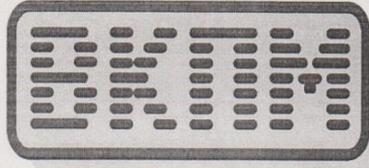
19.09.2017	057231	2017132524
Дата поступления	Входящий №	Регистрационный №

Заявление о выдаче патента Российской Федерации на изобретение

<b>ДАТА ПОДАВАНИЯ</b> (дата регистрации) оригинала заявки 19 СЕН 2017	(2) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ №	ВХОДЯЩИЙ №
(85) ДАТА ПЕРЕВОДА с иностранной заявки на национальную фазу		
<input type="checkbox"/> (86) регистрационный номер международной заявки и дата международной подачи, упоминаемые международная классификация	<b>АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ</b> (почтовый адрес, факс и электронная почта) Российская Федерация, 123317, Москва, в/л 22, ООО «МБЦ «Генериум», ОПС: Телефон: +7(495) 988-47-94 Факс: Адрес электронной почты: zayevleva@ibcgenium.ru	
<input type="checkbox"/> (87) номер и дата международной публикации международной заявки	<b>АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ</b> (указывается при подаче заявки на секретное изобретение)	
<input type="checkbox"/> (96) (номер европейской заявки и дата ее подачи)		
<input type="checkbox"/> (97) (номер и дата публикации европейской заявки)		
<b>ЗАЯВЛЕНИЕ</b> о выдаче патента Российской Федерации на изобретение	В Федеральную службу по интеллектуальной собственности Бережковская наб., д. 30, корп. 1, г. Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация	
<b>(54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ</b> СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ НЕПРЕРЫВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК СНО		
<b>(71) ЗАЯВИТЕЛЬ</b> (фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) физического лица или наименование юридического лица (полностью юридический документ); место жительства или место нахождения; паспорт (серия и номер) (индекс) Общество с ограниченной ответственностью «Международный Биотехнологический Центр «Генериум» (RU), 127006, Москва, ул. Садовая-Триумфальная, 4-10, Российская Федерация	<b>ИДЕНТИФИКАТОРЫ ЗАЯВИТЕЛЯ</b> ОГРН 1117746417766 КПП 771001001 ИНН 7710090030 СНИЛС ДОКУМЕНТ (серия и номер) КОД СТРАНЫ (если не упомянут) RU	
<input type="checkbox"/> изобретение создано за счет средств федерального бюджета Заявитель является: <input type="checkbox"/> государственным заказчиком <input type="checkbox"/> муниципальным заказчиком исполнитель работ (укажите наименование) <input type="checkbox"/> исполнителем работ по: <input type="checkbox"/> государственному контракту <input type="checkbox"/> муниципальному контракту заказчик работ (укажите наименование) Контракт от № _____ к	<input type="checkbox"/> патентный поверенный <input type="checkbox"/> представитель по доверенности <input type="checkbox"/> представитель по заказу	
<b>(74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ</b> (фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) физического лица, наименование юридического лица, наименование должности лица, выполняющего функции представителя для заявителя для получения патента от его имени в Федеральной службе по интеллектуальной собственности (национальная фаза и стадия заявки)) Фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) Завецова Елена Владимировна Адрес в/л 58, Зеленоград, Москва, 124498	Телефон: +7(495)988-47-94 доб.71 37 Факс: Адрес электронной почты: zayevleva@ibcgenium.ru Регистрационный номер патентного поверенного 1622	
Срок представительства (если с указанием срока доверенности) предоставителя заявки, срок может не указываться) 27.03.2020		

Общее количество документов в листах	52	Лицо, зарегистрировавшее документы Совцо Ю.Д. 
Из них: - количество листов комплекта изображений изделия (для промышленного образца)	0	
Количество платёжных документов	2	
Сведения о состоянии делопроизводства по заявкам размещаются на сайте ФИПС по адресу «www.fips.ru» в разделе «Информационные ресурсы / Открытые реестры»		

Приложение В. Справка о депонировании клеточной линии СНО 11А8-  
GNR044



**Всероссийская Коллекция  
Промышленных Микроорганизмов  
ФГУП ГосНИИГенетика**

Россия, Москва, 117545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ФГУП ГосНИИГенетика - ВКПМ;  
☎ (095) 3151210; факс: (095) 3151210; Эл. почта: vkpm@genetika.ru;

Форма ВКПМ-ВР/4

№ 169

**НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ**

**СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ**

Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (ВКПМ)  
ФГУП ГосНИИГенетика приняла на национальное патентное депонирование  
культуру клеточной линии:

СНО 11А8-GNR044

Дата депонирования: 12 июля 2016 года.

Депозитор: ООО «МБЦ «Генериум»

Продукт, продуцируемый штаммом (область применения штамма):

Рекомбинантное гуманизованное моноклональное антитело

**РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ: Н-169**

Директор ВКПМ  
д.б.н., проф.



Синеокий С.П.

Приложение Г. Разрешение на проведение клинических исследований  
препарата Омализумаб производства компании «Генериум»



**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**РАЗРЕШЕНИЕ № 88**  
**на проведение клинических исследований**  
**от 16 февраля 2017 г.**

Настоящим разрешается проведение клинических исследований  
**Омализумаб**  
(наименование лекарственного препарата)

Организация, осуществляющая организацию проведения клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения:  
**разработчик лекарственного препарата АО «ГЕНЕРИУМ», Россия, 601125, Владимирская область, Петушинский район, пос. Вольгинский, корпус № 17, Россия.**

Лекарственная форма и дозировка лекарственного препарата для медицинского применения: **лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения 150 мг.**

Наименование протокола клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: **№ ОМА-НVL-I «Открытое, рандомизированное, сравнительное исследование в параллельных группах фармакокинетики, фармакодинамики, иммуногенности и безопасности препаратов Омализумаб (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия) и Ксолар («Новартис Фарма АГ», Швейцария) после их однократного подкожного введения здоровым добровольцам в дозе 150 мг».**

Цель клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: **сравнительная оценка фармакокинетики, фармакодинамики, иммуногенности и безопасности препаратов Омализумаб и Ксолар.**

Сроки проведения клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: **с 16.02.2017 по 28.02.2018 г.**

Количество пациентов, принимающих участие в клиническом исследовании лекарственного препарата для медицинского применения: **96 человек (из них рандомизированных 84).**

Перечень медицинских организаций, в которых будет проводиться клиническое исследование лекарственного препарата для медицинского применения: **согласно приложению №1 на 1 л.**

Данное разрешение действительно в течение всего срока проведения  
клинических исследований.

**005436**

БЛАНК НЕ ВНЕДРЕТСЯ В ЦЕЛЮЩИЙ МАТЕРИАЛ, используется ЗАО «СИНТЕКО» (лицензия № 01-05-00003) ФГИС Роспотребнадзора, ул. Мухоморова, д. 13, Москва, 125080, тел. (495) 776-31-27, www.sinteco.ru, 2017 г.