УДК 57.088.3

ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ В АСПЕКТЕ СОВРЕМЕННЫХ ТРЕБОВАНИЙ К КАЧЕСТВУ И БЕЗОПАСНОСТИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Устинникова О.Б., Рунова О.Б., Новикова Е.В.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва, e-mail: Ustinnikova@exmed.ru

На основе анализа отечественных и международных нормативно-правовых документов рассмотрены основные требования к качеству и безопасности современного производства биотехнологических лекарственных препаратов. А также отражены особенности производства препаратов рекомбинантных факторов свертывания крови трех поколений в аспекте данных требований: используемые клеточные линии и стабилизаторы, способы очистки целевого продукта и инактивации контаминирующих агентов, проблемы связанные с наличием белков животного происхождения.

Ключевые слова: рекомбинантные факторы свертывания крови, стабилизаторы, питательные среды, способы вирусной инактивации, ионообменная хроматография

RECOMBINANT BLOOD COAGULATION FACTORS PRODUCTION TECHNOLOGY AND MODERN ASPECTS AND REQUIREMENTS TO QUALITY AND SAFETY OF BIOTECHNOLOGY MEDICATIONS

Ustinnikova O.B., Rounova O.B., Novikova E.V.

Scientific Center for Expertise of Medical Application Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, e-mail: Ustinnikova@exmed.ru

Basic quality and safety requirements to modern biotechnological medicines production based on national and international regulatory and legal documents are considered. Production features of recombinant blood coagulation factor products of three generations according to these requirements, namely: employed cell lines and stabilizers, methods of purification of the target product and contaminating reagents inactivation, problems linked to existing animal proteins, are also considered.

Keywords: recombinant blood coagulation factors, stabilizers, culture media, viral inactivation methods, ion-exchange chromatography

К настоящему времени достигнут предел развития базовых технологий получения факторов свертывания крови из плазмы крови человека. Их дальнейшее развитие не предполагает выхода за пределы частных усовершенствований технологий выделения и очистки. В связи с этим, на первый план выходят рекомбинантные факторы свертывания крови (РФСК), возможность модификации молекул которых, позволяет снизить интенсивность и частоту выработки ингибирующих антител, что открывает новые перспективы развития заместительной терапии [11, 10].

Препараты РФСК относятся к группе биотехнологических лекарственных препаратов (БЛП), производство которых осуществляется с использованием технологии рекомбинантной ДНК – технологии контролируемой экспрессии генов, кодирующих биологически активные белки в прокариотах и эукариотах, включая измененные клетки млекопитающих [9].

Ключевым аспектом производства БЛП является обеспечение постоянства выхода целевого белка заданной молекулярной структуры, которая определяет фармацевтические свойства готового продукта [18]. Гарантией стабильности процесса получения БЛП, наряду с подтверждением качества готового продукта, служит соблюдение современных требований к производству данного типа препаратов.

В первую очередь должна быть охарактеризована клеточная линия, которая в последующем будет использована для получения соответствующего продукта. Знание основных биологических характеристик клеточной линии и их стабильность в течение установленного срока культивирования позволяет определить влияние процесса культивирования на производимый продукт, определяет требования и методы контроля.

Клеточные культуры, полученные из клеток или тканей человека и животных, должны быть исследованы на подлинность, бактериологическую стерильность, контаминацию посторонними агентами согласно утвержденным требованиям [2,3,4].

Система банков клеток ГБК (главного банка клеток) и РБК (рабочего банка клеток) является основой стабильности выпуска ле-

карственного препарата соответствующего качества. ГБК, как правило, является производным от отобранного клеточного клона, содержащего экспрессирующую конструкцию. РБК получают размножением клеток из одной или более ампул ГБК [6].

Цель оценки экспрессирующей конструкции – подтверждение того, что в клетку хозяина введена нуклеотидная последовательность, соответствующая требуемому белку, и что она сохраняется в клеточной культуре до конца продуктивного периода. Необходимость оценки экспрессирующей конструкции диктуется возможностью возникновения мутаций в последовательности генов рекомбинантного белка, продуцируемого в живых клетках, что может изменять его свойства и привести к негативным последствиям при использовании готового лекарственного препарата, полученного на основе данного белка [1].

После длительного культивирования требуется собрать данные о молекулярной целостности гена и о фенотипических и генотипических характеристиках клеток хозяина. Подтверждение генетической стабильности штамма-продуцента должно заключатся в определении копийности гена, уровня и постоянства экспрессии белка и подтверждении подлинности структуры целевого продукта [9,2,5].

Таким образом, технология создания препаратов РФСК должна быть основана на валидированной системе посевного материала, в которой используется штамм-продуцент, соответствующий международным и отечественным требованиям, где требования к сырью следует рассматривать как требования к клеткам-продуцентам, банкам клеток, родительским клеткам, среде для культивирования, а также характеристике экспрессирующей конструкции [9, 18, 6, 5].

Поскольку эндогенные факторы свертывания крови являются гликопротеидами, основными клеточными линиями при производстве РФСК являются эукариотические субстрат зависимые клетки BHK (Baby hamster kidney) – клетки почки новорожденного хомячка, CHO (Chinese hamster ovary) – клетки яичника китайского хомячка и HEK (human embryonic kidney) – эмбриональные клетки почки человека. Использование данных клеточных культур в качестве продуцента, позволяет получать белки, обладающие стабильной структурой с необходимой аминокислотной последовательностью и профилем гликозилирования. В таблице представлены особенности технологии препаратов РФСК, зарегистрированных в Российской Федерации.

Однако процесс культивирования эукариотических клеток нуждается в применении культуральных сред, содержащих компоненты сыворотки животного происхождения, что является источником дополнительного риска для пациента в отношении бактериальной, вирусной и прионной безопасности, а также развития аллергических реакций из-за остаточного содержания гетерологичных белков. В случае применения сред, содержащих потенциально опасные компоненты, технология производства должна включать стадии очистки и вирусной/бактериальной элиминации [12].

Кроме того, в первые препараты РФСК в качестве стабилизатора входил человеческий сывороточный альбумин (ЧСА). В последующих препаратах, по рекомендации Всемирной Федерации гемофилии (World Federation of Hemophilia) ЧСА был заменен на соединения, основанные на молекулах сахаров (сахароза, трегалоза, маннитол).

Поиск возможностей культивирования рекомбинантных клеток в отсутствие сыворотки и животных белков привел к созданию препаратов РСФК третьего поколения при производстве которых, в отличие от препаратов первого и второго поколения, используют синтетические питательные среды DMEM/HAM F12, 199, RPMI с добавлением гидролизата сои, например пептонов из соевой муки, расщепленных ферментативно папаином. Подобные технологии часто бывают заявлены как «основанные на безсывороточной среде». Однако, при крупномасштабном промышленном производстве, исходный клон клеток зачастую размножают в присутствии сыворотки до накопления большого количества клеточного пула с высокой плотностью монослоя клеток. Перед сбором продукта среду роста заменяют на поддерживающую среду, которая и является безсывороточной, не содержащей животных белков. Таким образом, исключается нежелательное воздействие возможных гетерологичных белковых компонентов, однако все риски контаминации сохранены, хотя и снижены.

В связи с этим остается актуальным освобождение от контаминации занесенными агентами невирусного происхождения (микоплазмы, бактерии, грибы), вирусная контаминация и контаминация агентами, вызывающими трансмиссивную губчатую энцефалопатию (ТГЭ). Эффективные стратегии должны включать контроль и испытания исходных материалов, сырья, реагентов и вспомогательных веществ; испытания на отсутствие занесенных агентов на критичесикх этапах производства; валидированные методики по инактивации/удалению контаминирующих агентов [13,14,8].

Особенности технологии производства препаратов РСФК, зарегистрированных в РФ

Наименование МНН	Линия штамма-продуцента	Экспрессирующая конструкция	Наличие белков животного, человеческого происхождения в культуральной среде	Способ очистки продуцируемого белка	Способ вирусной инактивации	Стабилизатор
Первого поколения						
Октоког альфа	СНО	Нуклеотидная последовательность эндогенного ФСК VIII + фактор WF	Бычий сывороточный альбумин, инсулин, апротинин	Иммуноаффинная хроматография	Пастеризация	Человеческий сывороточный альбумин
Второго поколения						
Октоког альфа	СНО	Нуклеотидная последовательность эндогенного ФСК VIII	Белки плазмы человека, инсулин	Иммуноаффинная хроматография	Обработка с использованием растворителя/ детергента (ТБФ, тритон-100)	Сахароза
Октоког альфа	ВНК	Нуклеотидная коследовательность ФСК VII	Эмбриональная телячья сыворотка, инсулин	Иммуноаффинная хроматография + анионообменная хроматография	Диафильтрация, стерилизующая фильтрация	Маннитол
Октоког альфа	ВНК	Нуклеотидная коследовательность ФСК VII	Эмбриональная телячья сыворотка, инсулин	Иммуноаффинная хроматография + анионообменная хроматография	Ультрафильтрация, стерилизующая фильтрация	Сахароза, маннитол
Мороктоког альфа	СНО	Нуклеотидная последовательность ФСК VIII с делецией В домена	Эмбриональная телячья сыворотка	Катионнообменная, иммуноаффинная, анионообменная хроматография	Обработка с использованием растворителя/ детергента (ТБФ, тритон-100)	Сахароза
Нонаког альфа	СНО	Нуклеотидная последовательность ФСК IX	Эмбриональная телячья сыворотка	иммуноаффинная, анионообменная хроматография	Тангенциальная фильтрация с тритоном-100	Сахароза
Нонаког альфа	СНО	Нуклеотидная последовательность ФСК IX	Эмбриональная телячья сыворотка	иммуноаффинная, анионообменная хроматография	Тангенциальная фильтрация с тритоном-100	Сахароза
Третьего поколения						
Октоког альфа	СНО	Нуклеотидная последовательность эндогенного ФСК VIII + фактор WF	Соевый гидролизат без добавления сыворотки/компонен-тов сыворотки человеческого/ животного происхождения	Иммуноаффинная хроматография	Обработка с использованием растворителя/ детергента (ТБФ, тритон-100)	Трегалоза, маннитол
Мороктоког альфа	СНО	Нуклеотидная последователь-ность эндогенного ФСК VIII с делецией В домена	Соевый гидролизат без добавления сыворотки/компонентов сыворотки человеческого/ животного происхождения	Аффинная хроматография на основе синтетического лиганда	Обработка с использованием растворителя/ детергента + нанофильтрация	Сахароза

Один из методов должен инактивировать или удалять оболочечные вирусы (ВИЧ, вирусы гепатита В и С), а другой метод – безоболочечные вирусы (вирус гепатита А).

В соответствии с рекомендациями ВОЗ, стадия считается эффективной, если она обеспечивает редукцию патогенов в 10^4 раз и более [7].

Для большинства рекомбинантных препаратов крови традиционным является метод обработки растворитель-детергент. Этот метод является неспецифическим и позволяет инактивировать все вирусы с липидной оболочкой: в частности ВИЧ, вирусы гепатита С и В, а также возможные неизвестные вирусы с липидной оболочкой. Применяемые детергенты ТВИН 80 или ТРИТОН Х-100 в сочетании с гидрофобным растворителем три-н-бутилфосфатом разрушают липопротеиновые мембраны. Оставшиеся фрагменты нуклеиновой кислоты не обладают патогенным действием. В присутствии детергента невозможны обратные соединения или регенерация мембран. Эффективность данного метода зависит от температуры и времени воздействия.

Тепловой способ вирусной инактивации применяется для воздействия на оболочечные вирусы (ВИЧ, гепатиты В и С) и на вирусы, не имеющие оболочек (гепатит А, парвовирус В19). Эффективность данной вирусной инактивации зависит от комбинации нескольких факторов воздействия на вирус: температурный режим, экспозиция установленной температуры, физическое состояние препарата, содержание соли, природа и концентрация стабилизатора . Тепловой режим варьируют от 80°С до 100°С, экспозиция от 30 минут до 72 часов. В настоящее время практически всеми фирмами применяется т.н. «тепловой шок»: температурный режим 100°С в течение 30 минут. Частным случаем теплового способа является метод пастеризации – тепловая обработка при температуре 60^0С.

Помимо метода растворитель/детергент и тепловой обработки третьим неспецифическим методом инактивации вирусов является нанофильтрация. Стадия нанофильтрации может быть включена как основной метод вирусной инактивации, так и для осуществления дополнительного уровня вирусной безопасности. Степень удаления вирусов зависит от размера пор используемого фильтра. В методе нанофильтрации используются фильтры с размерами пор от 15 до 35 нм. Так, на конечной стадии очистки препарата «РеФакто» применяли фильтр Viresolve-180 –тангенциальный вариант компании Millipore Corp, США. Метод нанофильтрации обладает очевидными преимуществами: отсутствие контаминации со стороны химических реактивов, отсутствие денатурирования белков.

Для получения высокоочищенного продукта в процессе производства чаще всего используются аффинная и ионообменная хроматография.

Наиболее часто используют ионообменную хроматографию. Разработано множество вариантов технологий с использованием анионо- и катионообменников, например, на основе DEAE-сефарозы, Q-сефарозы, CM-сефарозы, SP-сефарозы, DEAE-сферосила, сефакрила S-300 и других.

Аффинную хроматографию, основанную на специфическом взаимодействии с лигандами также используют для очистки продукта.

Для проведения этой стадии традиционно используют моноклональные антитела, но сорбенты на их основе обладают рядом существенных недостатков: ограниченным сроком службы, относительно медленной скоростью адсорбции целевого белка. Кроме того, при элюции целевого белка происходит уменьшение количества иммобилизованных антител. Наилучшей альтернативой традиционным иммуносорбентам являются аффинные сорбенты с иммобилизованными пептидомиметиками или не биологическими синтетическими лигандами [17,16].

Так, на стадии аффинной хроматографии моноклональные антитела могут быть заменены синтетическим лигандом, представляющим собой полипептид, разработанным для устранения потенциального заражения мышиным вирусом [15].

Такие сорбенты в наименьшей степени подвержены деградации ферментами и не загрязняют продукт иммуногенными биополимерами и наилучшим образом подходят для очистки белков фармацевтического применения.

Таким образом, по типу используемых клеток-продуцентов, стабилизаторов и состава питательных сред, а также способов инактивации препараты РФСК подразделяют на три поколения, отличия в технологии производства которых представлены в таблице. Последнее (третье) поколение наиболее полно отвечает современным требованиям к качеству и безопасности данного типа лекарственных средств.

Список литературы

1. Волкова Р.А., Авдеева Ж.И., Эльберт Е.В. Требования к характеристике экспрессирующей конструкции и очищенного белка при проведении доклинических испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов генной инженерии // Биопрепараты. – 2011. – № 3.

2. Генно-инженерные рекомбинантные ЛС: монография 01/2008:0784 // Издание Европейской Фармакопеи на русском языке. 7 изд. Том I. – С. 927–930.

3. Дьяконов Л.П. Животная клетка в культуре: методы и применение в биотехнологии. – М., 2009. – 656 с.

4. Кулешов К.В. Методические рекомендации по определению принадлежности клеточных культур методом полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ). – М., 2008. – 19 с.

5. Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК: ОФС 1.7.1.007.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Том II [Электронный ресурс]. – URL: http://193.232.7.107/feml (дата обращения: 05.11.2015 г).

6. Производство и контроль качества лекарственных препаратов, полученных методом рекомбинантной ДНК: директива ЕМА 75/318/ЕЕС. 1995. 12 с.[электронный ресурс]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003127.pdf (дата обращения: 24.11.2015).

7. Руководство по инактивации и процедурам удаления вирусов в целях обеспечения безопасности продуктов человеческой крови и плазмы: Технический отчет ВОЗ. Серия № 924, приложение 4. 2004.

8. Руководство по снижению риска распространения губчатой энцефалопатии через препараты, предназначенные для медицинского и ветеринарного применения. EMEA/C 24/03. [Электронный ресурс] URL: http://www.ema.europa.eu/ema/ (дата обращения: 24.11.2015).

9. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том 3. Глава 1. Оценка качества биологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов рекомбинантной ДНК. – М., 2014. – С. 344.

10. Устинникова О.Б., Рунова О.Б., Новикова Е.В. Актуальные направления разработки лекарственных средств на основе рекомбинантных факторов свертывания крови // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. – № 9. – С.3–6.

11. Устинникова О.Б., Рунова О.Б., Новикова Е.В. Рекомбинантные факторы свертывания крови: особенности структуры и оценки качества // Молекулярная медицина. – 2015. – № 6. – С.3–7.

12. Burger C. An Integrated Strategy for the Process Development of a Recombinant Antibody-Cytokine Fusion Protein Expressed in BHK Cells // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. Vol. 52. P. 345–353.

13. EMA. Guideline transgene expression in higher: EMEA/CHMP/BWP/48316/2006 [Электронный ресурс]. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003154.pdf (дата обращения: 24.11.2015).

14. ICH Q5A. Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin [Электронный ресурс] URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5A_R1/Step4/Q5A_R1__Guideline.pdf (дата обращения: 24.11.2015).

15. Kelley B.D. Development and validation of an affinity chromatography step using a peptide ligand for GMP production of factor VIII // Biotechnology Bioengineer. – 2004. – № 87. – P. 400–412.

16. Morrill P. Rational combinatorial chemistry-based selection, synthesis and evaluation of an affinity adsorbent for recombinant human clotting factor VII // Journal of Chromatography. 2002. № 774. P. 11.

17. Perugini M. Hematopoietic growth factor mimetics: From concept to clinic // Cytokine & Growth Factor Reviews. 2009. № 20. P. 87–94.

18. WHO. Guidelines on the quality, safety and efficacy of biotherapeutic protein product prepared by recombinant DNA technology. Annex 3 // WHO Technical Report Series. – 2013. – № 814.