

На правах рукописи

ВОРОНИНА ЕКАТЕРИНА ВЛАДИМИРОВНА

**Разработка технологии получения моноклонального
антитела к фактору некроза опухолей альфа в целях
биофармацевтического производства**

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

*Диссертации на соискании ученой степени
кандидата биологических наук*

Москва – 2018

Работа выполнена в отделе медицинской биотехнологии государственного бюджетного учреждения Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра "Курчатовский институт" на базе департамента экспериментального производства ООО «ФАРМАПАРК».

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,
директор по науке ООО «ФАРМАПАРК», Серегин Юрий Александрович
г. Москва

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, руководитель
лаборатории биологически активных
наноструктур НИИ эпидемиологии и Лунин Владимир Глебович
микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи
Минздравсоцразвития,
г. Москва

кандидат биологических наук, заместитель
исполнительного директора по разработке
и производству АФС АО «Биохимик», Купцов Василий Николаевич
г. Саранск

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ), г. Москва

Защита состоится «___» _____ 2018 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д217.013.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра "Курчатовский институт" по адресу: 117545, г Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1. Тел.: +7(495)315-37-47, e-mail: genetika@genetika.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке НИЦ «Курчатовский институт»-ГосНИИГенетика и на сайте <http://www.genetika.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
Кандидат химических наук, доцент

Воюшина Т. Л.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Генно-инженерные биологические препараты, созданные на основе моноклональных антител (мАТ) – одно из передовых направлений фармакотерапии в клинической практике нынешнего времени. Использование моноклональных антител в качестве терапевтических агентов явилось для медицины стратегическим этапом в смене концепции лечения – от неспецифической к специфической (таргетной) терапии.

На сегодня одной из наиболее важных мишеней терапевтических моноклональных антител является фактор некроза опухоли альфа (ФНО-альфа), играющий особую роль в иммунопатогенезе ревматоидного артрита. Ингибиторы ФНО-альфа постоянно фигурируют в списках самых востребованных биофармацевтических препаратов в мире, лидером из которых за последние годы является Хумира (моноклональное антитело адалимумаб) компании Abbott. Причина его популярности заключается не только в широком спектре применения против воспалительных заболеваний разной природы, таких как ревматоидный артрит [Broeder et al., 2002], псориаз [Chew, et al., 2004], болезнь Крона [Shaye, et al., 2005] и др., но и в ряде его преимуществ перед аналогами своей группы [Лучихина и др., 2008]. Во-первых, полностью гуманизированная структура антитела обеспечивает низкую степень иммуногенности, что сокращает риск развития побочных эффектов и сохраняет клиническую эффективность. Во-вторых, для адалимумаба характерна стабильность эффекта при многолетнем применении, что было показано в длительном рандомизированном клиническом исследовании [Лучихина и др., 2008]. Кроме того, в настоящее время адалимумаб имеет уже 10 показаний к применению [Jaffe et al., 2016]. В России мАТ адалимумаб успешно применяется с 2006 года и входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов.

Истечение срока патентной защиты оригинального мАТ адалимумаб открыло возможность развитию рынка его аналогов. Разработка технологии получения отечественного аналога полностью гуманизированного моноклонального антитела адалимумаб в целях биофармацевтического производства предоставит возможность снизить его стоимость и позволит системам здравоохранения уменьшить нагрузку на

бюджет, повысить его доступность для большего числа пациентов и сэкономить средства для последующего инвестирования в новые области.

Цель и задачи исследований. Целью данного исследования является разработка опытно-промышленной технологии получения моноклонального антитела адалимумаб на основе эукариотической линии клеток СНО (клетки яичников китайского хомячка).

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Создать клеточную линию, стабильно экспрессирующую мАТ адалимумаб.
2. Установить характеристики качества мАТ адалимумаб, определяемые и моделируемые на этапе культивирования.
3. Осуществить скрининг сред и подпиток в рамках оптимизации условий культивирования в малом объеме для достижения максимальной продуктивности и оценить соответствие качества продукта установленным характеристикам.
4. Оценить значимость различий качественных характеристик биоподобного и оригинального мАТ адалимумаб в рамках его изменчивости.
5. Осуществить масштабирование разработанной технологии в биореакторах разных типов и выбрать условия, которые обеспечивают стабильное промышленное производство мАТ адалимумаб надлежащего качества с полноценными иммунобиологическими свойствами в объемах, требуемых в роли жизненно необходимого лекарственного средства.
6. Провести три установочные серии культивирования в оптимизированных условиях для подтверждения стабильности и воспроизводимости процесса.
7. Подтвердить биоподобие мАТ адалимумаб, получаемого по разработанной технологии, в сравнении с оригинатором.
8. Оценить экономическую эффективность разработанной технологии.

Научная новизна. Создана стабильная клеточная линия на основе СНО, продуцирующая мАТ адалимумаб и депонирована во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт» -

ГосНИИгенетика». Впервые проведено сравнение эффективности технологии культивирования суспензионных клеток CHO и качества производимого моноклонального антитела в трех типах биореакторов: с механической мешалкой, волновом и орбитальном. Разработаны оригинальные подходы для оптимизации профиля гликозилирования полученного моноклонального антитела. Впервые установлена зависимость эффективности связывания антитела с рецептором FcγRIIIA (CD16a) от содержания маннозного гликана Man5.

Практическая значимость и внедрение результатов научных исследований в производство. Выполненные научные исследования и результаты, полученные в настоящей работе, могут быть учтены и использованы в качестве востребованных решений практических задач на этапах разработки технологий производства современных высокоэффективных лекарственных препаратов. Разработанная технология будет применена для организации производства мАТ адалимумаб на площадке ООО «Фармапарк», относящегося к классу жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств, используемого для лечения аутоиммунных заболеваний, в первую очередь ревматоидного артрита.

Личный вклад соискателя. Вклад соискателя состоит в получении, обработке и интерпретации экспериментальных данных, подведении итогов работы, подготовке публикаций. Стабильная клеточная линия, экспрессирующая моноклональное антитело адалимумаб, получена в ходе совместных исследований автора и группы сотрудников департамента экспериментального производства ООО «Фармапарк». Автором обоснована возможность использования двух стратегий отбора клонов-продуцентов для получения стабильной клеточной линии, проведена работа по исследованию стабильности полученной клеточной линии, создан мастер-банк продуцента, проведены его паспортизация и депонирование, выполнены эксперименты по оптимизации условий и параметров культивирования, изучению влияния подпиток, добавок, типа биореактора на качество и количество целевого продукта, а также по масштабированию процесса. Работы по очистке и выделению моноклонального антитела адалимумаб из культуральной жидкости, а также

разработка аналитических методик проводились совместно с сотрудниками департамента экспериментального производства ООО «Фармапарк».

Апробация результатов работы. Результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на XV Международной научной конференции «High-Tech in Chemical Engineering (Москва, 2014), на VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015), на втором форуме CellCulture&BioProcessing (Берлин, 2015), на VI Всероссийской молодежной научно-технической конференции и школе молодых ученых (Москва, 2015), на IX Международной научно-практической конференции «Биотехнология в комплексном развитии регионов» (Москва, 2016), на Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2017), на заседании секции «Молекулярная биология» Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра "Курчатовский институт" 10 апреля 2018 года (Москва).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 9 научных работ, из которых две статьи в изданиях, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий (перечень ВАК), статья в зарубежном журнале, индексируемом в Web of Science и Scopus и шесть публикаций, цитируемых в базе РИНЦ.

Объем и структура и диссертации. Диссертационная работа изложена на 222 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов, выводы, сведения о практическом использовании результатов, рекомендации по использованию научных выводов. Список использованной литературы включает 262 источника, из них 223 зарубежных авторов. Материалы диссертации содержат 21 таблицу, 55 рисунков.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ И РЕЗУЛЬТАТЫ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Амплификация общего пула трансфицированных клеток с последующим отбором клонов методом предельных разведений на платформе CHO-DG44 является

эффективным и быстрым подходом для разработки клона-продуцента моноклонального антитела.

2. Культивирование в реакторе волнового типа с периодическим добавлением подпитки и применением двухфазного температурного режима позволяет повысить продуктивность процесса.

3. Основной характеристикой моноклонального антитела, корректировку которой требуется осуществить на этапе разработки технологии культивирования, является профиль гликозилирования, определяющий эффекторные функции молекулы.

4. Внесение сахарозы при культивировании позволяет эффективно повысить долю гликана Man 5, определяющего эффекторные свойства моноклонального антитела.

5. Разработанная технология позволяет осуществлять стабильное промышленное производство биоаналога моноклонального антитела адалимумаб с полноценными иммунобиологическими свойствами, обеспечивая его безопасное и эффективное применение в объемах, требуемых в роли жизненно необходимого лекарственного средства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Последовательности генов тяжелой и легкой цепей мАТ адалимумаб были получены из общедоступных источников информации и патентных баз данных, оптимизированы по кодонному составу для клеток CHO и заказаны в фирме «Сервис-ген» (Санкт-Петербург). Для внеклеточной секреции антитела в культуральную жидкость к последовательностям легкой и тяжелой цепей были добавлены сигнальные пептиды человеческого альбумина и дополнительные рестриктивные сайты по 5'- и 3'-концам.

Стабильную клеточную линию, продуцирующую мАТ адалимумаб, получали методом амплификации числа копий генов в дигидрофолат/метотрексатной системе, что подразумевало использование коммерческих плазмидных векторов (Thermofisher, США) на основе рOptiVec (маркер селекции DHFR) и рcDNA (маркер селекции Neo) и линии клеток CHO DG44 (Thermofisher, США) дефицитной по гену дегидрофолатредуктазы (DHFR). Гены тяжелой (HC) и легкой цепей (LC) мАТ адалимумаб по отдельности клонировали в каждый вектор. Таким образом, были

получены четыре экспрессионные плазмиды: pOptiVEC-LC, pOptiVEC-HC, pcDNA-LC, pcDNA-HC, из которых методом транзientной котрансфекции выбрали сочетание pOptiVEC-HC и pcDNA-LC (рис. 1) по максимальному уровню экспрессии полноразмерного мАТ адалимумаб в культуральную жидкость (КЖ).

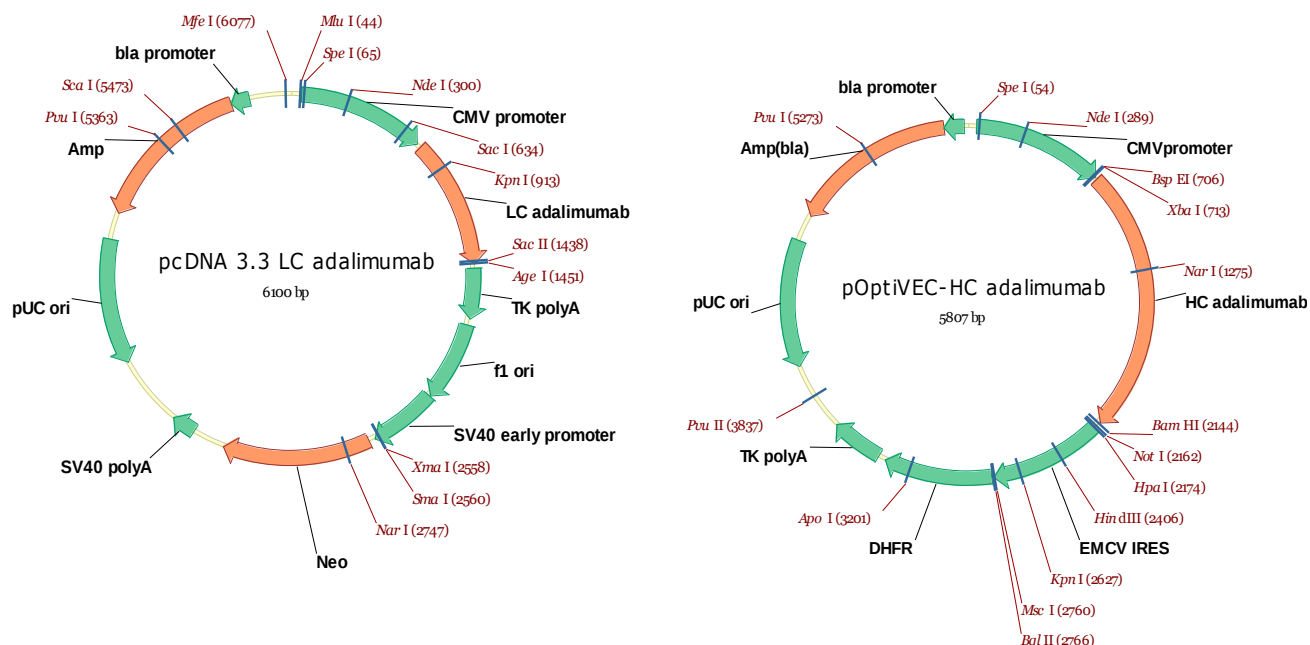


Рисунок 1 – Карты экспрессионных векторов pcDNA-LC и pOptiVEC-HC

Котрансфекцию культуры клеток CHO-DG44 осуществляли векторами pOptiVEC-HC и pcDNA-LC с использованием липофильного агента Freestyle MAX 2000 (Invitrogen, США) согласно протоколу фирмы производителя. Селекцию трансфектантов по легкой цепи осуществляли под действием 500 мкг/мл генетицина (Lonza, Швейцария), по тяжелой цепи мАТ адалимумаб - 50 нМ метотрексата (Sigma, США). Использовали две стратегии отбора клонов-продуцентов и амплификации трансгена. Согласно первой стратегии, на следующий день после трансфекции засеивали клетки в концентрациях 100, 500 и 1000 клеток/лунку и отбирали наиболее продуктивные минипулы. Затем осуществляли масштабирование минипулов, адаптацию к перемешиванию и последовательную амплификацию в присутствии 25 нМ, 500 нМ, 1000 нМ метотрексата. Амплифицированные минипулы субклонировали методом предельных разведений в 96-луночных планшетах в концентрации 0,5 клеток/лунку для получения индивидуальных клонов-продуцентов.

Согласно второй стратегии через сутки после котрансфекции проводили селекцию клеток, несущих трансген, до достижения жизнеспособности пула более

90%, затем осуществляли амплификацию в присутствии 1000, 2500 и 5000 нМ метотрексата. Методом предельных разведений в концентрации 0,5 клетки/лунку проводили отбор индивидуальных клонов-продуцентов из общего амплифицированного пула.

Продуктивность клонов-продуцентов в культуральной жидкости определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА). Соотношение экспрессии тяжелой и легкой цепей антитела проверяли методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в восстанавливающих условиях с окрашиванием Кумасси.

Стабильность уровня экспрессии клонов-продуцентов исследовали в рамках пассирования культуры клеток в течение двух месяцев без селективных антибиотиков в колбах Эрленмейера при перемешивании. Каждые четвертые сутки измеряли концентрацию антитела в образцах культуральной жидкости методом ИФА и вычисляли удельную продуктивность (пг/клетку/день).

Культивирование суспензионной культуры клеток CHO в малом объеме осуществляли в шейкере-СО₂-инкубаторе Multitron Cell (Infors, Швейцария) в атмосфере 5% СО₂ при температуре 37 °С, относительной влажности 95% и скорости перемешивания (120±10) об/мин в колбах Эрленмейера (Corning, США).

Подсчет числа клеток и жизнеспособности проводили с помощью автоматического счётчика клеток TC-10 (Bio-Rad, США).

Длительные циклы культивирования проводили с периодическим добавлением подпиток как по схемам, рекомендованным производителями, так и с их адаптацией, с ежедневным контролем клеточной плотности, жизнеспособности, глюкозы, лактата и pH. Подпитки вносили каждые сутки, начиная с третьего дня культивирования. При необходимости добавляли глюкозу (PanReac/AppliChem, Испания) до концентрации (5±1) г/л, учитывая ее содержание в подпитке и скорость метаболизма клеток.

Для оптимизации условий культивирования клеточной линии использовали ряд питательных сред и подпиток от разных производителей (Таблица 1).

Таблица 1 – Список сред и подпиток, использованных в разработке технологии культивирования продуцента мАТ адалимумаб

Производитель	Среда	Подпитка
GE Healthcare (Hyclone/PAA) США	SFM4CHO Hyclon CDM4CHO ActiCHO ActiCHO P (производитель заменил на ActiPro)	Cellboost 1–6 ActiCHO Feed A/B (производитель заменил на Cellboost 7A/B)
Life Technologies (Gibco) США	Dynamis OptiCHO	Efficient Feed A+,B+, C+
Amimed Швейцария	MAM-PF77	FMS3, FMU
Merck Германия	Cellvento 200/210/220	Cellvento Feed 200/210/220
Sigma-Aldrich США	EX-Cell Advanced	EX-Cell Advanced Feed 1
Irvine Scientific США	BalanCD Growth A	BalanCD Feed 2
Lonza Швейцария	PowerCHO-2CD	PowerFeed A

Масштабирование проводили в биореакторах перемешивающего типа Labfors (Infors HT, Швейцария) и Applikon (BioBundle, Нидерланды) с набором стеклянных колб объемом 3 л и 7 л, на качающейся платформе Appliflex с системой управления ez-Control (Applikon, Нидерланды) и орбитального типа Kühner SB10X и SB50X (Kühner AG, Швейцария) с одноразовыми мешками на 10 и 50 л. Посевная плотность составляла $(0,5 \pm 0,1) \times 10^6$ клеток/мл, значение pH и содержание растворенного кислорода (DO) поддерживали на уровне $(7,0 \pm 0,2)$ и (40 ± 10) %, соответственно. Регуляцию pH осуществляли с помощью подачи CO₂ и 0,5 М NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, США), уровня растворенного кислорода – в начале процесса осуществляли азотом и воздухом, затем воздухом и кислородом по мере увеличения концентрации жизнеспособных клеток и скорости потребления кислорода.

Культивирование при механическом перемешивании проводили со скоростью вращения мешалки типа «морской винт» от 80 до 150 об/мин, в волновом биореакторе – при 25 об/мин с углом наклона платформы 8 градусов, в орбитальном биореакторе –

от 80 до 110 об/мин. Культивирование в условиях однофазного температурного режима осуществляли при 37 °С, в двухфазном – путем снижения температуры с 37 до 35 °С при плотности больше 20×10^6 клеток/мл, затем до 33 °С через 7-16 часов.

Культуральную жидкость осветляли методом последовательной фильтрации на капсулах Sartoclear PB1 (диаметр пор 11-4 мкм) и PB 2 (8-1 мкм), и стерилизовали фильтрацией на Sartopore 2 XLG (0.8+0.2 мкм) (все - Sartorius, Германия). Выделение мАТ адалимумаб из культуральной жидкости проводили методом аффинной хроматографии на сорбенте MabSelect SuRe LX с последующей очисткой методами анионообменной хроматографии на сорбенте Capto Q Sepharose и катионообменной хроматографии на сорбенте Capto S (все сорбенты – GE, США). В полученных аффинных элюатах определяли концентрацию белка методом спектрофотометрии. Перевод в буфер готовой лекарственной формы осуществляли методом тангенциальной фильтрации.

Анализ профиля гликанов осуществляли методом хромато-масс-спектрометрии после обработки мАТ адалимумаб ферментом N-гликозидазой (Roche, Швейцария).

Исследование биологической активности *in vitro* выполняли на культуре клеток WEN164 фибросаркомы мыши по принципу ингибирования моноклональным антителом адалимумаб токсичного влияния ФНО-альфа на линию клеток.

Эффективность связывания моноклонального антитела с рецептором FcγRIIIA осуществляли методом ИФА.

Характеризацию гетерогенности получаемого антитела по составу заряженных изоформ проводили с помощью ионно-обменной хроматографии с последующим изoeлектрическим фокусированием после предварительной обработки ферментами карбоксипептидазой В и N-гликозидазой (оба Roche, Швейцария).

Сравнение биоподобия полученного мАТ адалимумаб проводили в сравнении с оригинальным в составе препарата Хумира (Веттер Фарма, Германия)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение клеточной линии, стабильно продуцирующей моноклональное антитело. В результате котрансфекции суспензионной клеточной

линии CHO DG44 (dhfr-) векторами pOptiVEC-HC и pcDNA-LC были получены пулы, из которых выбирали индивидуальные клоны-продуценты по двум стратегиям.

Согласно первой стратегии были получены 27 клонов с удельной продуктивностью от 9 до 73 пг/клетку/день. Из них 13 перспективных клонов адаптировали к культивированию при перемешивании в колбах. В рамках исследования стабильности уровня экспрессии наблюдали падение удельной продуктивности в среднем от 30 до 70%. В результате анализа клонов в цикле продукции с периодическим добавлением подпитки было обнаружено, что все клоны росли очень медленно (время удвоения от 40 до 50 часов) и имели склонность к агрегации. Это привело к возникновению ряду трудностей, в связи с чем, было предложено исключить их из дальнейших исследований.

Вторая стратегия позволила существенно сократить время по сравнению с первой и получить 6 перспективных клонов-продуцентов с удельной продуктивностью от 20 до 35 пг/клетку/день. Было показано, что в рамках субкультивирования клонов в течение двух месяцев уровень удельной продуктивности стабилизировался в среднем от 6 до 10 пг/клетку/день. Для того чтобы выбрать конкретный клон-продуцент в качестве клеточной линии, клоны адаптировали на некоторые среды (табл. 1) и сравнивали их ростовые характеристики, продуктивность, как в коротких циклах продукции, так и в условиях длительного культивирования с подпитками.

В случае культивирования клонов в цикле продукции на среде ActiCHO с комплексной подпиткой ActiCHO Feed A/B было обнаружено, что для клона #26 характерны высокая скорость роста и способность достигать высокой клеточной плотности более 40 млн клеток/мл на 13-й день культивирования (рис. 2А). Благодаря этому общее количество мАТ адалимумаб на последний день составило около $0,9 \pm 0,1$ г/л (рис. 2Б). Так как результаты были получены в неоптимизированных условиях, это послужило положительной предпосылкой для оптимизации культивирования с целью повышения количества продукта. Полученные результаты для клона #26 были подтверждены в экспериментах на других средах и подпитках, и, таким образом,

позволили выбрать этот клон в качестве клеточной линии-продуцента, названной CHO-DHFR-ADMB26.

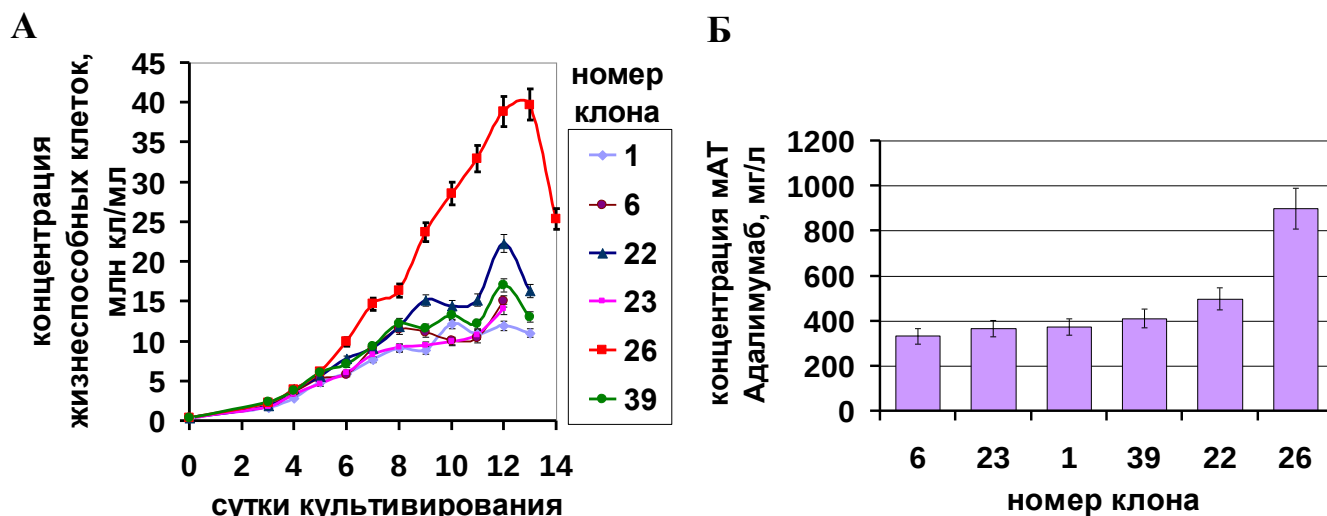


Рисунок 2 – Кривые роста лучших клонов (**А**) и концентрация мАТ адалимумаб в КЖ на последний день культивирования (**Б**) в цикле продукции на среде ActiCHO с комплексной подпиткой ActiA/B

Подбор оптимального сочетания среды и подпитки для культивирования.

На первом этапе культуру клеток линии CHO-DHFR-ADMB26 адаптировали к ряду доступных коммерческих сред (табл. 1) и проводили короткие циклы культивирования без внесения подпитки в течение четырех суток для того, чтобы оценить влияние состава среды на ростовые характеристики и продуктивность. Было обнаружено, что вся линейка сред обеспечивала хорошие результаты, за исключением сред MAM-PF77, EX-Cell Advanced и CDM4CHO, по причине сравнительно низких значений удельной продуктивности и времени удвоения больше 30 часов.

На втором этапе исследовали ростовые характеристики и продуктивность клеточной линии в цикле культивирования на выбранных средах с периодическим добавлением подпиток (табл. 1). Выбирали не все возможные комбинации сред и подпиток, а только те, которые с наибольшей вероятностью могли обеспечить высокий результат культивирования на основе собственных и литературных данных. При этом каждая подпитка была проанализирована не менее чем с двумя средами разных производителей. Таким образом, удалось повысить продуктивность клеточной линии в 1,8 раз до $1,6 \pm 0,1$ г/л в случае использования сочетания среды Dynamis и

комплексной подпитки ActiCHO Feed A/B (рис. 3). Наряду с этим следует отметить, что общая продуктивность более 1 г/л была также показана и в ряде других случаев, что сочеталось с данными по максимуму клеточной плотности.

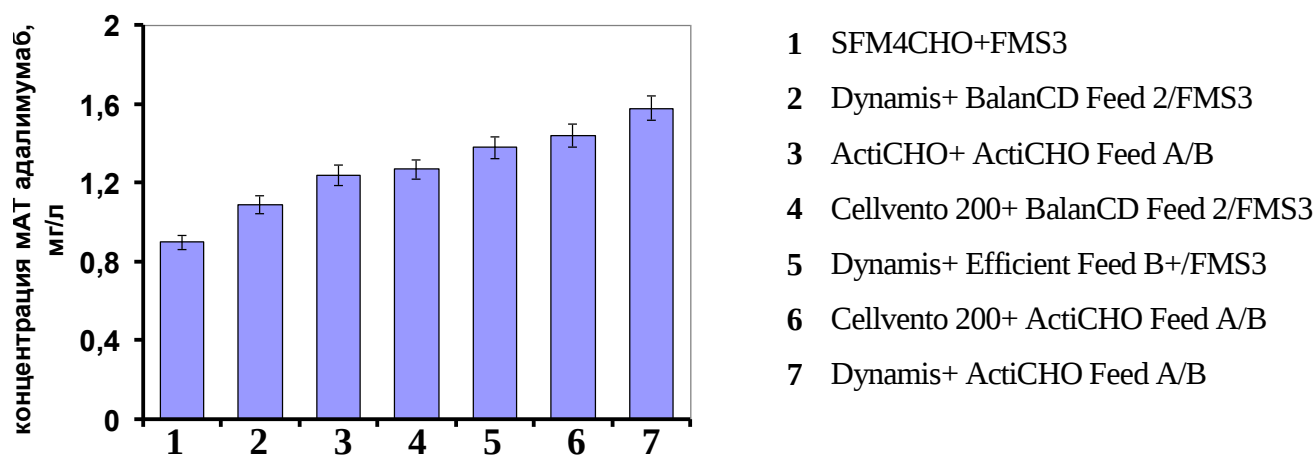


Рисунок 3 – Концентрация мАТ адалимумаб в КЖ на последний день, полученная в результате цикла продукции клона #26 на разных по составу средах и подпитках

При выборе среды и подпитки принимали во внимание не только количество экспрессируемого мАТ адалимумаб, но и его качество, которое должно было соответствовать оригинальному антителу в составе препарата Хумира. Качественный и количественный состав гликанов является важной характеристикой моноклонального антитела, определяющей как эффекторные функции молекулы, так и ее фармакокинетику. С учетом уровня общей продуктивности было показано, что использование комбинации среды Dynamis и комплексной подпитки ActiCHO Feed A/B, обеспечивающей максимальное количество мАТ адалимумаб в КЖ за цикл культивирования, гарантирует и достаточно близкое содержание гликозилированных форм (рис. 4).

Единственным существенным отличием оставалось содержание минорного гликана Man5, состоящего из остатков маннозы, – $1,7\% \pm 0,3$ против $6,3\% \pm 2,1$ в оригинальном антителе (рис. 4). Учитывая известный факт в литературе, что нефукозилированные гликаны, которым и является Man5, вносят существенный вклад в связывание антитела с рецептором FcγRIIIA на поверхности НК-клеток, обуславливающего опосредованную антителами клеточную цитотоксичность, было предложено провести сравнительный анализ связывания полученного мАТ адалимумаб и оригинального с рецептором FcγRIIIA. В результате было

подтверждено, что эффективность связывания полученного продукта на порядок ниже оригинального (рис. 5 А) – значение полумаксимальной эффективной концентрации EC_{50} 1650 нг/мл против 190 нг/мл (оригинальное мАТ). Вследствие этого стала очевидной необходимость оптимизации состава гликанов.

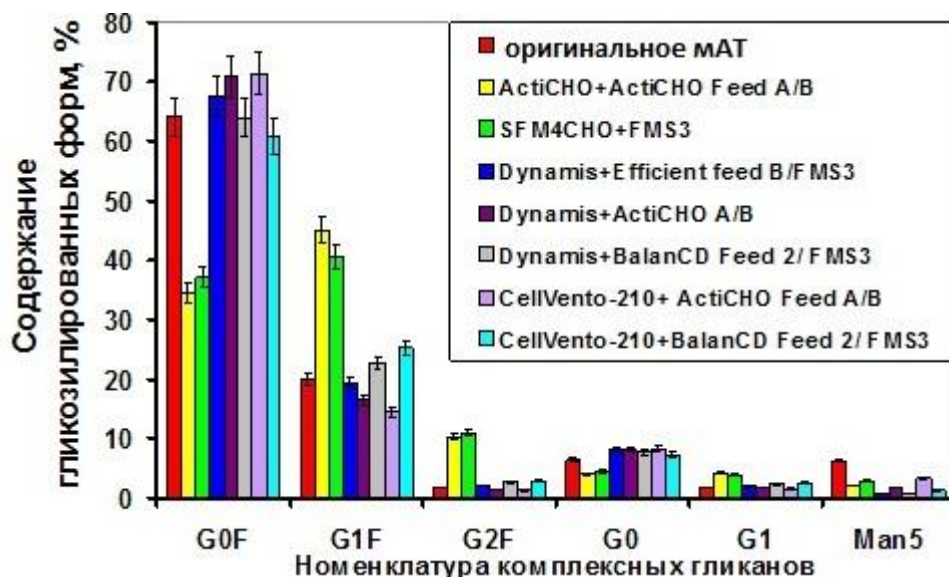


Рисунок 4 – Содержание гликозилированных форм в исследуемых образцах мАТ адалимумаб и оригинального препарата (красный цвет)

Оптимизация профиля гликозилирования моноклонального антитела адалимумаб. Исследовали ряд добавок, рекомендованных в литературе для повышения гликана Man5: хлорид марганца, глюкозамин, хлорид натрия и монензин. Они оказались либо неэффективным, либо токсичными для культуры клеток, что негативно влияло на ростовые характеристики и общий выход продукта. Было обнаружено, что предпочтительным агентом для повышения доли Man5 является сахароза в конечной концентрации 60 мМ, и ее добавление при культивировании обеспечивает наиболее близкое к оригинальному содержание Man5 – $(4,5 \pm 0,2)$ % против $(4,7 \pm 0,2)$ % (рис. 5Б), а также гарантирует эффективное связывание с рецептором FcγR3A – значение EC_{50} $(1,4 \pm 0,1)$ нМ против $(1,2 \pm 0,1)$ нМ (рис. 5В), соответственно. Кроме того, дополнительное внесение сахарозы позволяет сохранить культуральные характеристики и продуктивность клеточной линии. Наряду с этим, степень галактозилирования удалось скорректировать путем сочетания сред Dynamis и ActiCHO в соотношении 12:1, что позволило получить аналогичный профиль гликозилирования полученного мАТ адалимумаб в сравнении с оригинальным препаратом в рамках его изменчивости (рис. 5Г).

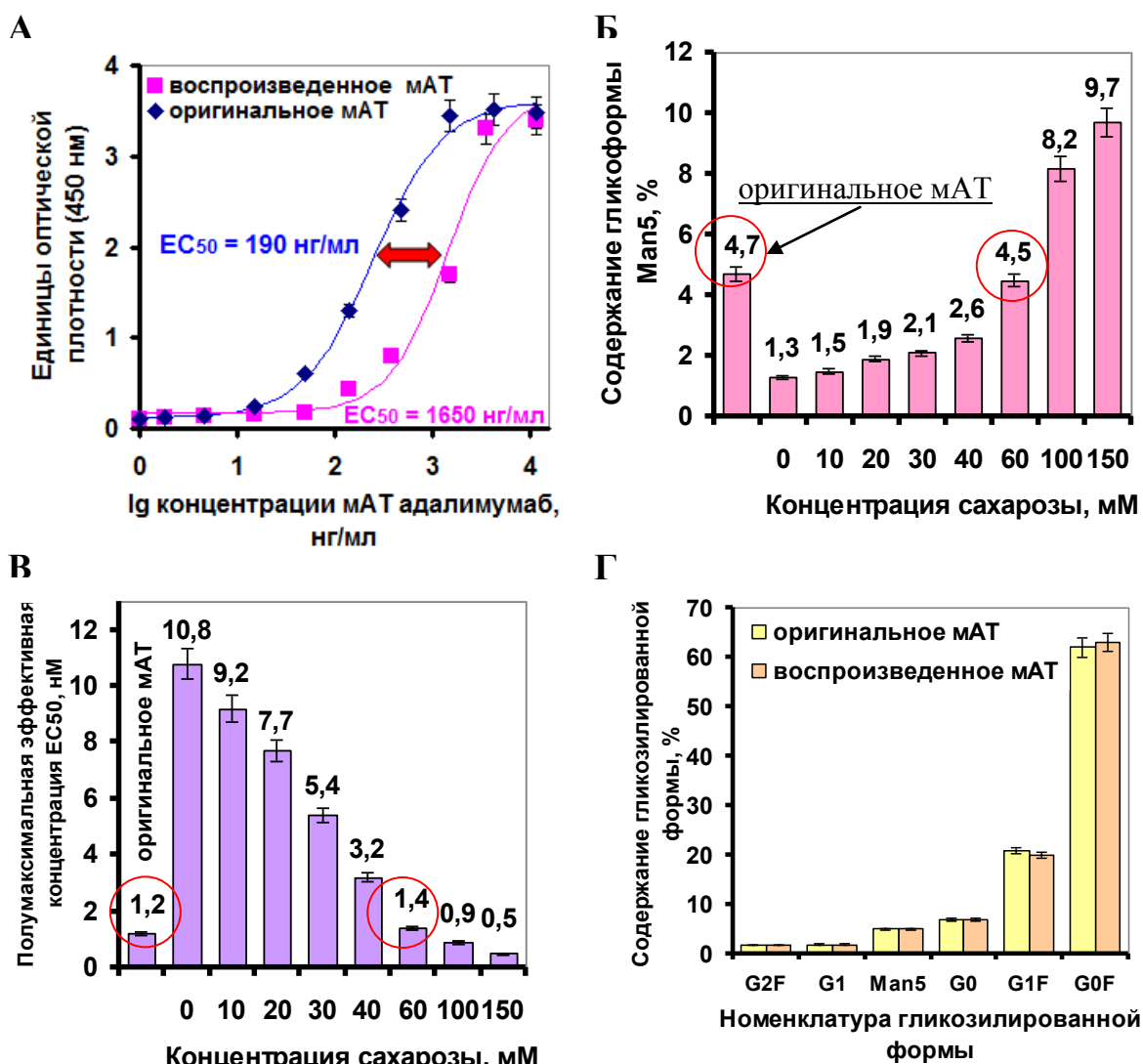


Рисунок 5 – Сравнительная оценка связывания МАТ адалимуаб биоподобного и оригинального с рецептором FcγRIIIA методом твердофазного ИФА (**А**); Содержание доли Man5 в зависимости от концентрации сахарозы при культивировании (**Б**); Эффективность связывания МАТ адалимуаб с рецептором FcγRIIIA в зависимости от концентрации сахарозы при культивировании (**В**); Сравнение профилей гликозилирования биоподобного МАТ адалимуаб и оригинального в составе препарата Хумира (**Г**)

Масштабирование технологии культивирования клеточной линии для производства моноклонального антитела адалимуабю. Было показано, что разработанная технология культивирования клеточной линии в малом объеме успешно реализуется и воспроизводится во всех типах биореакторов. Показано, что культивирование в реакторе волнового типа Appliflex обеспечивает более благоприятные условия и позволяет достичь максимальные количество и требуемое качество продукта в рамках изменчивости оригинального антитела. Применение двухфазного температурного режима культивирования позволило повысить

эффективность процесса и увеличить выхода целевого продукта до $(1,9 \pm 0,2)$ г/л (табл. 2) при сохранении профиля гликозилирования.

Таблица 2 – Сводные результаты по культивированию в разных типах биореакторов

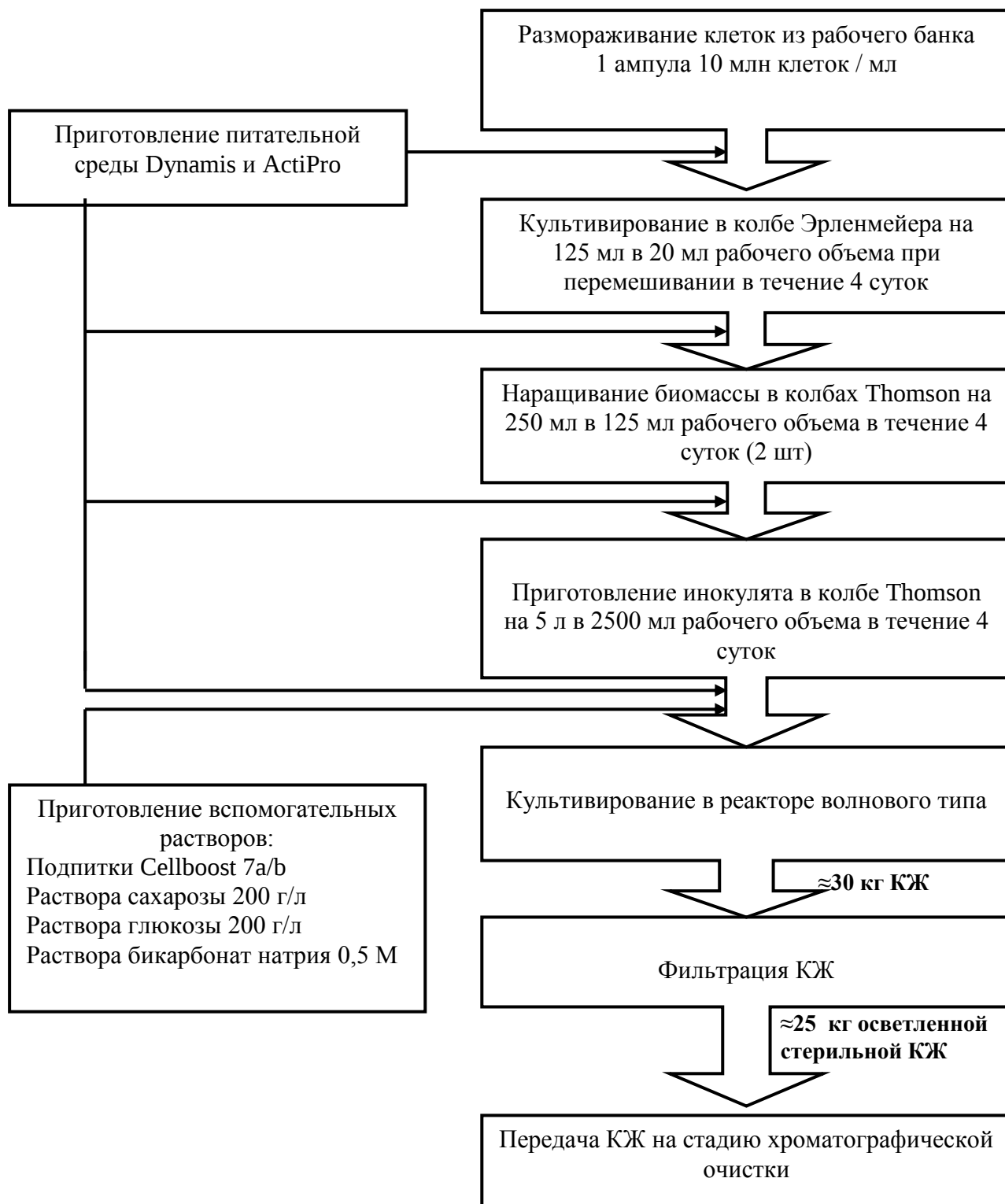
Платформа									
	Labfors	Applikon	AppliFlex		Labfors	AppliFlex		Kühner SB10X	
Объем биореактора, л	7	7	10	50	7	10	50	10	50
Тип перемешивания	механический		волновой		механический	волновой		орбитальный	
Температурный режим	37°C				снижение с 37 до 33 °C				
Выход антитела в КЖ, г/л	0,8±0,3		1,5±0,2		1,6±0,1	1,9±0,2		1,4±0,1	
Длительность, дни	9-11		13		19	17	19	16	

Исследования биоподобия мАТ адалимумаб. Биоподобие было успешно подтверждено в сравнении с оригинальным препаратом по количеству и качеству гликозилированных форм, составу заряженных изоформ, а также в анализе биологической активности *in vitro* на чувствительной клеточной линии WEN164. Показаны идентичные результаты в сравнении с референтным препаратом в исследованиях токсичности при многократном подкожном введении, иммуногенности и местнораздражающего действия у яванских макаков. Эффективность мАТ адалимумаб была подтверждена в исследованиях на модели артрита на трансгенных мышях Tg197. Препарат рекомендован для проведения клинических исследований.

Оценка стабильности и экономической эффективности технологии культивирования. В результате проведения трех установочных серий в волновом биореакторе объемом 50 л была подтверждена стабильность процесса культивирования по таким параметрам, как скорость роста, уровень продукции мАТ адалимумаб, качественный и количественный состав гликанов, а также биологическая активность. Таким образом, разработанная технология позволяет осуществлять стабильное промышленное производство биоаналога моноклонального антитела адалимумаб с полноценными иммунобиологическими свойствами, обеспечивая его безопасное и эффективное применение в объемах, требуемых в роли жизненно необходимого лекарственного средства. По результатам оценки экономической эффективности разработанной технологии примерная стоимость дозы производимого мАТ адалимумаб составляет около 4000 руб., то есть примерно 6% от рыночной стоимости оригинального препарата.

Технологическая схема процесса

Разработанная технология культивирования включает несколько базовых стадий. Подготовительным этапом для каждой стадии служит приготовление необходимых растворов и питательных сред.



ВЫВОДЫ

1. Создана клеточная линия CHO-DHFR-ADMB26, стабильно экспрессирующая мАТ адалимумаб, способная расти при высоких плотностях более 40 млн клеток/мл в режиме длительного культивирования с подпиткой. Показаны продуктивность ($0,9 \pm 0,1$) г/л в неоптимизированных условиях и стабильный уровень экспрессии при пассировании в течение 2 месяцев. Создан банк клеточной линии и депонирован в ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика».

2. Установлено, что одной из важных характеристик, корректировку которой можно и нужно осуществить на этапе разработки технологии культивирования, является профиль гликозилирования, определяющий как эффекторные функции молекулы, так и ее фармакокинетику.

3. Осуществлен подбор условий суспензионного культивирования клон-продуцента мАТ адалимумаб для достижения максимального выхода продукта ($1,6 \pm 0,1$) г/л в режиме цикла культивирования на среде Dynamis (Gibco, США) с периодическим добавлением комплексной подпитки Cell Boost 7a/7b (GE, США). Показаны существенные различия в профиле гликозилирования полученного мАТ адалимумаб в сравнении с оригинальным по содержанию маннозного гликана Man5 и галактозилированных форм.

4. Подтверждено, что различия в профиле гликозилирования являются значимыми и требуют корректировки. Показано, что сахароза в концентрации 60 мМ является эффективным агентом для повышения содержания гликоформы Man5 с сохранением культуральных характеристик и продуктивности.

5. Осуществлено масштабирование разработанной технологии в биореакторах с разным типом перемешивания. Показано, что культивирование клеток CHO в биореакторе волнового типа на основе одноразовых мешков, является оптимальным для сохранения ростовых характеристик клон-продуцента и профиля гликозилирования. Показано, что применение двухфазного температурного режима позволяет увеличить длительность культивирования и повысить выход целевого белка до $1,9 \pm 0,2$ г/л.

6. Проведены 3 установочные серии культивирования продуцента мАТ адалимумаб в мешке объемом 50 л на волновом биореакторе, подтвердившие стабильность и воспроизводимость процесса.

7. Подтверждено биоподобие мАТ адалимумаб, получаемого по разработанной технологии, в сравнении с оригинальным антителом. Показаны аналогичные эффективность и безопасность биоаналога *in vitro* и *in vivo* в рамках доклинических исследований, получены рекомендации к проведению клинических испытаний.

8. Расчёт технико-экономических показателей подтвердил, что процесс производства мАТ адалимумаб с использованием разработанной технологии суспензионного культивирования является экономически выгодным: себестоимость культивирования составляет около 6% от рыночной стоимости препарата-оригинатора.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

Препарат мАТ адалимумаб, созданный с применением разработанной технологии суспензионного культивирования клеток СНО, успешно прошёл доклинические исследования с рекомендациями для проведения клинических испытаний и является высокоэффективным биоаналогичным лекарственным средством из группы ингибиторов ФНО-альфа.

Разработка технологии суспензионного культивирования осуществлялась в соответствии с правилами надлежащей производственной практики, утвержденными приказом Минпромторга России от 14.06.2013 № 916, и отвечает всем современным требованиям качества, предъявляемым к медицинским препаратам на основе рекомбинантных белков. В связи с этим технология рекомендуется к внедрению в серийное производство на площадке ООО «Фармапарк» для выпуска препарата, относящегося к классу жизненно-необходимых и важнейших лекарственных средств и используемого для лечения аутоиммунных заболеваний, в первую очередь ревматоидного артрита.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ

1. Voronina E.V. Development of genetic constructs for generation of adalimumab expressing cho cell line / E.V. Voronina, R.R. Shukurov, N.A. Litvinova, Y.A. Seregin, R.A. Khamitov, V.I. Shvetc // XV International Scientific Conference «High-Tech in Chemical Engineering». – М.: МИТХТ. – 2014. – С. 180.
2. Воронина Е.В. Создание штамма-продуцента антитела к фактору некроза опухоли альфа / Е.В. Воронина, Ю.А. Серегин, Н.А. Литвинова, В.И. Шве́ц, Шукуров Р.Р. VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – М.: ООО «Экспо-биохим-технологии». – 2015. – Т. 1. – С. 123-125.
3. Воронина Е.В. Оптимизация технологии культивирования клеток cho-dg44, экспрессирующих моноклональное антитело адалимумаб / Е.В. Воронина, Н.В. Лобанова, Н.А. Шамонов, Н. А. Романова, И. Н. Савинова, А.А. Клишин, Р.Р. Шукуров, В.И. Шве́ц, Ю.А. Серегин // VI Всероссийская молодежная научно-техническая конференция и школа молодых ученых «Научоемкие химические технологии». – М.: МИТХТ. – 2015. – С. 47.
4. Воронина Е.В. Подбор оптимальных условий культивирования клеток CHO, экспрессирующих моноклональное антитело адалимумаб, в замкнутом объеме с подпиткой / Е.В. Воронина, Н.В. Лобанова, Н.А. Шамонов, Н. А. Романова, И. Н. Савинова, А.А. Клишин, Р.Р. Шукуров, В.И. Шве́ц, Ю.А. Серегин // Международная научно-практическая конференция «Биотехнология в комплексном развитии регионов». М.: ООО «Экспо-биохим-технологии». – 2016. – С. 112.
5. Воронина Е.В. Оптимизация состава питательных сред для культивирования клеточной линии CHO - продуцента моноклонального антитела к фактору некроза опухолей альфа. / Е.В. Воронина, Н.В. Лобанова, А.В. Сухоженко, А.А. Клишин, И.Н. Савинова, Ю.А. Серегин // Биотехнология. – 2016. – Т.32. – №6. – С. 60-67.
6. Voronina E.V. Adjustment of quality profile for monoclonal antibody adalimumab produced in cho cells / E.V. Voronina, N.V. Lobanova, A.A. Klishin, N.A. Romanova, R.R. Shukurov, N.A. Shamonov, Y.A. Seregin // 2nd Cell Culture & BioProcessing Forum. Berlin – 2015. – С. 54.

7. Лобанова Н.В. Оптимизация маннозных гликанов при культивировании продуцента антител к фактору некроза опухоли альфа / Н.В. Лобанова, Е.В. Воронина, А.В. Сухоженко, Чеботарева А., Гардеева, Черепушкин С.А., Ю.А. Серегин // Биофармацевтический журнал. – 2017. – Т. 9. – № 3. – С. 3-13.
8. Воронина Е.В. Сравнение эффективности культивирования клеток cho, экспрессирующих моноклональное антитело адалимумаб, в биореакторах различного типа / Е.В. Воронина, Н.В. Лобанова, И.Р. Яхин, Е.В. Горожанина, Т.А. Хаджиев, А.В. Чеботарева, В.И. Швец, Ю.А. Серегин // Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – М.: ООО «Экспо-биохим-технологии». – 2017. – С. 188-190.
9. Voronina E. V. Design of a stable cell line producing a recombinant monoclonal anti-TNF α antibody based on a CHO cell line Producing Recombinant monoclonal antibody to tumor necrosis factor alfa based on CHO-DG44/ E.V. Voronina, Y.A. Seregin, N.A. Litvinova, V.I. Shvets, R.R. Shukurov // SpringerPlus. – 2016. – Т. 5. – № 1. – С. 1584.

Подписано в печать: 22.07.2018

Заказ № 000 Тираж – 100 экз.

Печать трафаретная. Объем 1 усл.п.л.

Типография «000000000»

ИНН

АДРЕС

ТЕЛЕФОН

САЙТ