

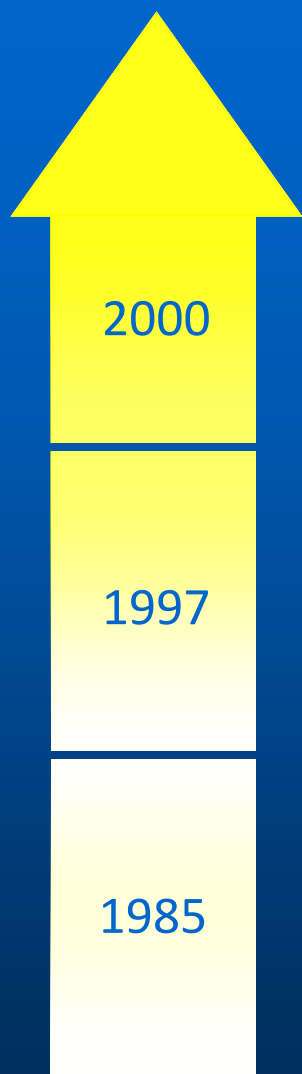
Рекомбинантные факторы в лечении гемофилии: прогресс в производстве и очистке

Проф. Брайан Колвин
Великобритания

Потребность в улучшенном продукте:

- **До 1960 г.:** возможности лечения были ограничены¹
- **В начале 1980-х:** 60–70% пациентов с тяжелой гемофилией в Западной Европе и США заразились ВИЧ, которым были контаминированы плпзменные препараты²
- **До 1985 г.:** концентраты факторов свертывания, не прошедшие термическую обработку, передавали гепатит, не относящийся к типам А и В (ГНОТАВ) почти всем пациентам, проходившим лечение в первое время^{3,4}
- **1994 г.:** гепатит А в плпзменных препаратах^{2,5}
 - Использование метода моющего растворителя для инактивации переносимых с кровью вирусов и хроматографической процедуры для очистки фактора VIII приводило к инактивации вирусов с капсулой, но по-прежнему не могло обеспечить инактивацию вирусов без капсулы, таких как гепатит А⁵

Прогресс в препаратах, полученных из плазмы: 1985–2000



- ПЦР-тестирование и карантинизация исходной плазмы²
- Введение нескольких вироцидных методов²
- Жесткий сухой нагрев человеческого фактора VIII¹
 - Сведение к минимуму риска передачи ГНОТАБ с > 90 % в необработанных концентратах до 0 % (доверительный интервал: 0%–9%)
 - Отсутствие передачи гепатита В или ВИЧ у реципиентов

1. Study group of the UK Haemophilia Centre Directors on Surveillance of Virus Transmission by Concentrates. *Lancet* 1988;2:814–6.

2. Mannucci PM. *J Thromb Haemost* 2003;1:1349–55

1990-е: оригинальные рекомбинантные препараты фактора VIII

■ Когенейт® и Рекомбинат®

- Представляли новейшую технологию (рДНК)
- Альбумин применялся для культивации клеток
- Конечный продукт содержал человеческий сывороточный альбумин

1997: разработка рекомбинантного фактора IX

- БенеФИКС® (первый и единственный продукт, который в настоящее время имеется в продаже)
 - Производится по технологии рДНК с использованием процессов производства и очистки без экзогенных продуктов человеческого и животного происхождения ²
 - Отсутствие альбумина в клеточной культуре и конечном продукте
 - Отсутствие необходимости в моноклональных антителах
 - В процессах очистки применяется многостадийная хроматография и нанофильтрация

1. BeneFIX® Coagulation Factor IX (Recombinant) Prescribing Information, Wyeth Pharmaceuticals Inc.

2. Harrison S, et al. *Semin Hematol.* 1998; 35(suppl 2):4–10.

2000+: доработанные и новейшие препараты фактора VIII

■ РеФакто® и Когенат FS®

- Удаление альбумина из конечного продукта¹

■ АДВЕЙТ®

- Усовершенствованные процессы производства
- Удаление альбумина из клеточной культуры²

1. Boedeker BGD *et al. Semin Thromb Hem.* 2007; 27: 385–394.

2. Shapiro AD. *Vasc Health Risk Manag.* 2007; 3: 555–565.

2008 г.: препарат фактора VIII высокой степени очистки

■ РеФакто АФ®

- Дополнительные усовершенствования процесса производства
 - Клеточная культивация без альбумина¹
 - Замена моноклонального антитела (МАТ) синтетическим лигандом²
 - Стадия нанофильтрации
 - фильтр с размером пор 35 нм

1. Kelley BD *et al.* Poster presented at: XVIII Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis; July 6-12, 2001; Paris.

2. Kelley BD *et al.* *Biotechnol Bioengineer.* 2004; 87: 400-412.

Развитие препаратов для лечения гемофилии



Производство следующего поколения рекомбинантных препаратов

Цель производства

Минимизация риска
инфекции

Плазменные препараты

- Страна происхождения плазмы
- Выбор донора
- Проверка на вирусы через антитела
- Тестирование на антигены и усложнение нуклеиновых кислот
- Проверка на вирусы и инаktivация пула плазмы

Рекомбинантные препараты

- Установление безопасности клеточной линии
- Устранение экзогенных человеческих или животных протеинов
- Стадии устранения и инаktivации вирусов для сокращения риска вирусного заражения

Технология производства рекомбинантных факторов высокой степени очистки

Рекомбинантный фактор IX
(BeneFIX)

Ключевые стадии производства рекомбинантного ФІХ (VeneFIX)



Стабильное внедрение генов ФІХ в клетки ЯКХ

1



Отбор клеточной линии

2

- Отбор клеточной линии, способной экспрессировать большие количества активного рФІХ при росте в биореакторах в питательной среде, полностью свободной от продуктов крови или плазмы

Стадии хроматографии и нанофильтрации, ни одна из которых не требует применения моноклональных антител

3

Очистка с помощью нанофильтрации

- Стадия нанофильтрации включена как дополнительный уровень вирусной безопасности¹
 - Фильтры Виресолв® с мембраной размером 70 отфильтровывает крупные протеины и вирусные частицы >70 кДа¹
- Стадии хроматографии и нанофильтрации прошли валидацию в плане удаления вирусов^{1,2}

«Виресолв» – зарегистрированная торговая марка «Миллипор Корпорейшн».

Валидация удаления вирусов

- Значительное ($> 10 \log_{10}$) сокращение за счет хроматографии и фильтрации

Вирус	Стадии процесса			
	Q-сефароза FF	Хелат-EMD-Cu (III)	Виресол в-70	Всего ЛС
A-MuLV (с обол.)	6,11	-	$>5,66$	$>11,8$
BPV (без обол.)	5,42	2,19	4,86	12,5
HSV (без обол.)	4,49	3,92	$>5,55$	$>14,0$
Reo-3 (без обол.)	5,45	0,15*	5,86	11,3

A-MuLV: вирус амфотропной мышинной лейкемии, штамм 292A

BPV: коровий парвовирус, штамм Dubovi

HSV: вирус человеческого герпеса тип 1, штамм McIntyre

Reo-3: реовирус тип 3, штамм Abney

Все значения соответствуют логарифмическому сокращению (ЛС)
*ЛС $< 1,0$ не включается в расчет общего ЛС

Технология производства рекомбинантных факторов высокой очистки

Рекомбинантный ФVIII
(РеФакто АФ)

Высокая очистка: отсутствие белков человеческого и животного происхождения

- Прогресс в процессе производства привел к достижению стадии очистки без экзогенных протеинов человеческого и животного происхождения



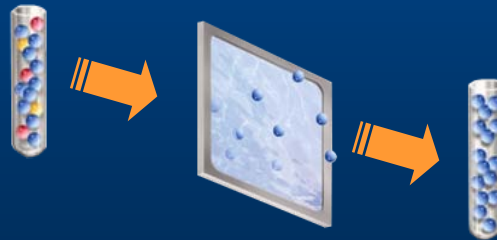
Полное отсутствие альбумина от клеточной культуры до конечного продукта^{1,2}

1



Уникальный синтетический лиганд, полностью свободный от животных материалов^{2,3}

2



Стадия нанофильтрации^{2,3}

3

Модифицированный процесс: разработка клеточной линии

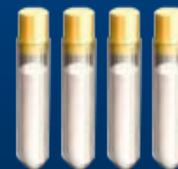
Отсутствие
альбумина

- Для удаления всех исходных материалов животного происхождения был создан новый базовый банк клеток



Родительская клетка яичника
китайского хомячка (ЯКХ)

Адаптирована к среде, не содержащей альбумин, консервируемой методом переохлаждения без сыворотки или альбумина.



Базовый банк клеток

Обширное генетическое тестирование показало, что новый базовый банк клеток представляет собой ту же самую клеточную линию.

Изменения в среде клеточной культуры

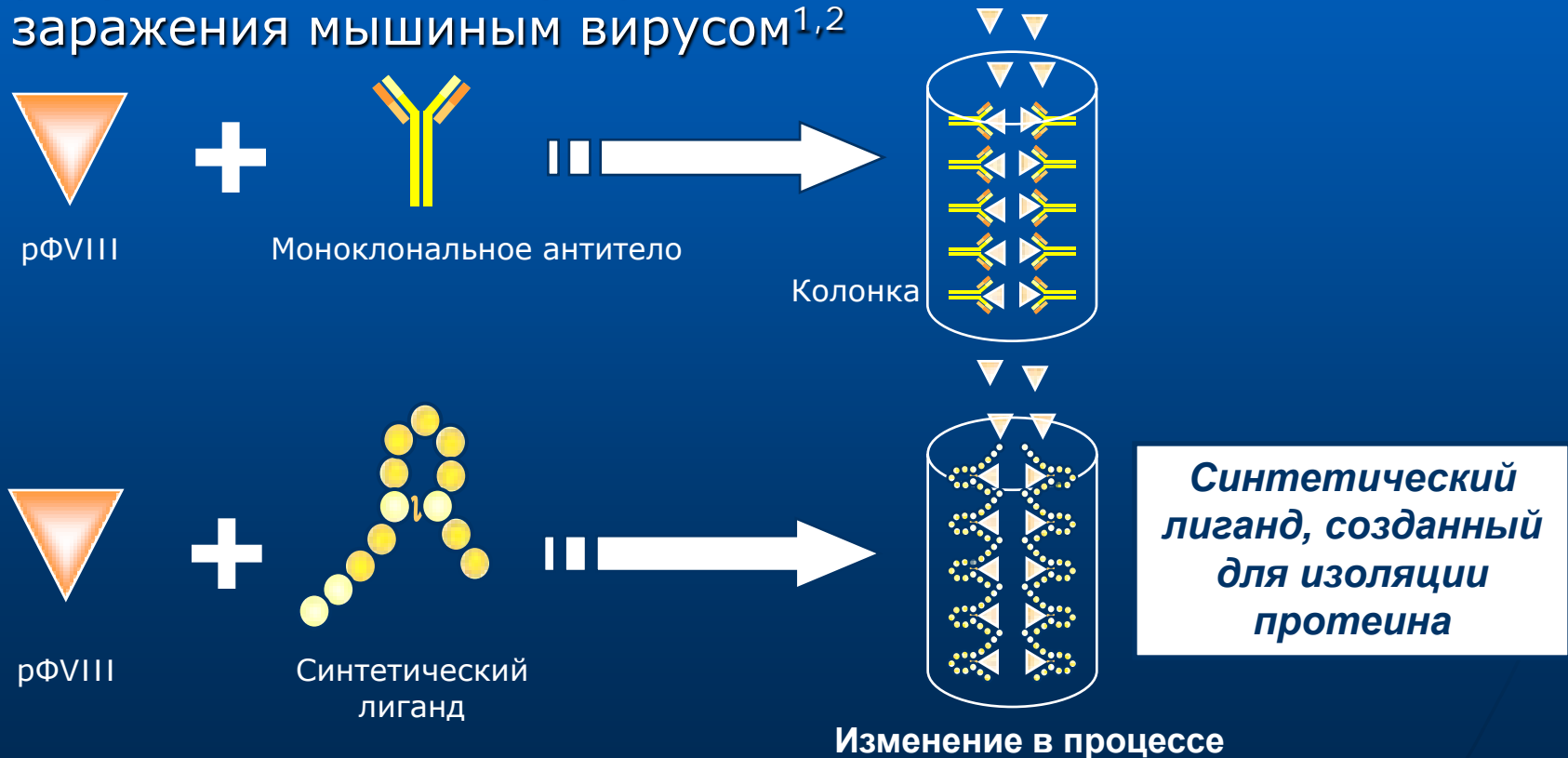


- Альбумин полностью удален из среды клеточной культуры
- Клеточная культура воспроизводится в полном объёме

**НИКАКИХ ИСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО
ИЛИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НЕ
ИСПОЛЬЗУЕТСЯ В ПРОЦЕССЕ ПРОИЗВОДСТВА**

Модифицированный процесс: вместо моноклонального антитела – синтетический лиганд

- На стадии высоко избирательной аффинной хроматографии применяется синтетический лиганд, разработанный для устранения потенциального заражения мышинным вирусом^{1,2}



Создание синтетического лиганда (TN8.2)

- 27-остаточный полипептид¹
- Химически синтезирован для обработки смолы
- Отобран методом фагового дисплея¹
- Зафиксирован на смоле для хроматографии¹
- Назван TN8.2 по клональному фаговому изоляту¹



	Удаление ДНК (ЛС*)	Удаление протеина ЯКХ (ЛС*)	Выход – преимущества рФVIII
МАТ	4,1	3,7	63 %
Лиганд	4,1	4,2	85 %

*ЛС = логарифмическое сокращение

Исследования безопасности аффинного лиганда (TN8.2)

- Уровень в лекарственной субстанции очень низок (<1 промилле)¹
- TN8.2 нетоксичен при избытке в 300 млн. раз на животной модели¹
- TN8.2 не создает помех для проведения лабораторных анализов коагулирующей активности при избытке в 1 млн. раз¹
- Выщелоченные уровни в пулах TN8.2 последовательны, а степень выщелачивания предсказуема¹
- Как минимум на одной стадии обработки TN8.2 удаляется¹

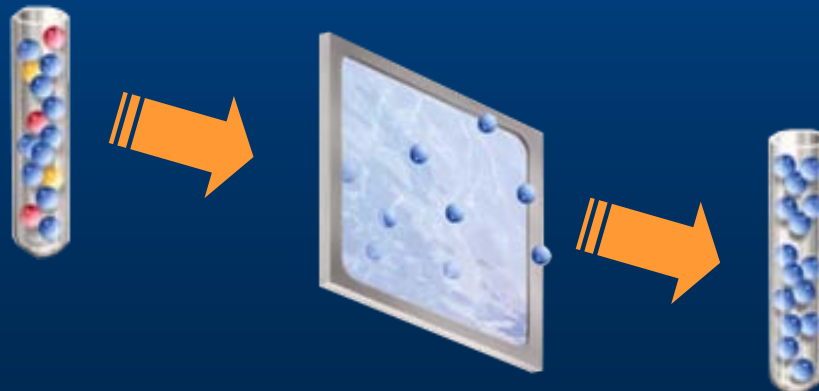
Модифицированный процесс: уровни чистоты РеФакто АФ

- Удаление протеина ЯКХ и ДНК на последовательных стадиях воспроизводимо и дает лекарственную субстанцию с низким уровнем примесей, полученных от клеток хозяина

	Предел	Партия			
		1	2	3	4
Примеси, полученные от клеток хозяина					
– ДНК	≤10 пг/КМЕ	<2	<2	<2	<6
– Протеин клеток хомячка	≤30 нг/КМЕ	1,1	1,2	1,5	1,1
Удаление технологических примесей					
– TN8.2 лиганд	<1 промилле	<1	<1	<1	<1

Модифицированный процесс: наночелювфилтрация вирусов

- Уникален для рекомбинантных продуктов ФVIII
- РеФакто АФ проходит через более мелкие поры
- Механизм отбора по размеру удаляет средние и крупные вирусы
- Не добавляются химические реактивы, а продукт не подвергается излишней нагрузке
- Интегрирован со применением хроматографии и инактивацией методом моющего растворителя



Прогресс в производстве и очистке: заключение

	КУЛЬТИВАЦИЯ КЛЕТОК		ОЧИСТКА		
	Состав без альбумина	Процесс без альбумина	Нет антител животного происхождения	Использование синтетического лиганда	Очистка методом нанофльтрации
Продукты из натурального ФVIII : Рекомбинат® Когенейт®					
Доработанные продукты ФVIII : РеФакто® Когенейт ФС®	★				
Самые свежие продукты ФVIII : АДВЕИТ®	★	★			
Рекомбинантный FIX: БенеФИКС®	★	★	Не требуется	★	★
ФVIII высокой очистки: РеФакто АФ®	★	★	★	★	★

Спасибо за внимание!