УДК 615.012.6

1 – Научно-производственная биотехнологическая платформа «ЭкспертБИОТЕХ», 123098, Россия, г. Москва, ул. Гамалеи, 18

1 – R&D and Pilot Plant Biotechnological Platform «ExpertBIOTECH», 18, Gamaleya str., Moscow, 123098, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail:
dmitriy.gusarov@expert-biotech.com

ВИРУСНАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Д.А. Гусаров[1]*

Резюме. Терапевтические препараты, получаемые из эукариотических биопродуцентов, могут нести в себе груз природных контаминантов, среди которых наиболее опасные для здоровья человека – вирусы. В статье поднимается проблема вирусной безопасности биофармацевтических лекарственных средств. Представлена схематическая стратегия стадий даунстрим-процесса, гарантирующих вирусную безопасность препаратов. Дано описание таких методов, как вирусная инактивация, фильтрация, очистка.

Ключевые слова: вирусы, биобезопасность, инактивация, нанофильтрация, хроматография.

VIRAL BIOSAFETY OF BIOPHARMACEUTICALS

D.A. Gusarov[1]*

Abstract. Therapeutics produced by eukaryotic cell lines could possible be contaminated with bioburden; the most dangerous for human is viral contamination. The article describes the problem of viral safety of biopharmaceuticals. The strategy of downstream process steps for the viral safety guarantee is discussed. The methods of viral inactivation, filtration, purification are given in the paper.

Keywords: viruses, biosafety, inactivation, nanofiltration, chromatography.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в фармобращении происходит революционное увеличение количества разрабатываемых и уже представленных на рынке биофармацевтических лекарств, таких как рекомбинантные белки, моноклональные антитела, препараты из донорской крови [1–3]. На сегодняшний день большая часть таких препаратов – это белки, получаемые с помощью технологии рекомбинантных ДНК и гибридомной технологии [4]. При этом биофармацевтические лекарства эволюционируют: с каждым днем появляется все большее количество сложных, больших молекул с посттрансляционными модификациями. Неудивительно, что растет популярность эукариотических хост-платформ для биосинтеза таких препаратов [5, 6]. Однако эукариотические платформы, в особенности на основе линий клеток млекопитающих, могут нести опасный груз природных контаминантов, к которым относятся вирусы, прионы, микоплазма.

С точки зрения европейских регуляторов, производитель должен гарантировать абсолютное отсутствие вирусов в биофармацевтических продуктах [7–10].

Такую гарантию можно дать только при обязательном выполнении следующих условий:

– использование биобезопасных материалов и сырья;

– аттестация клеточных линий до создания музея и в течение его сохранения;

– использование валидно эффективной стратегии даунстрим-процесса;

– тщательный внутриоперационный контроль.

Цель этой статьи – рассмотреть стратегию даунстрим-процесса, которая может гарантировать избавление от потенциальной вирусной контаминации.

ДАУНСТРИМ-ПРОЦЕСС

Даунстрим-процесс представляет собой цепочку шагов, которая гарантирует удаление нежелательных примесей при сохранении целевого продукта, и стратегия очистки от вирусов (размер вирусов от 20 до 300 нм) является его неотделимой частью.

Типичный даунстрим-процесс для выделения и очистки, например, моноклональных антител выглядит следующим образом:

1) сбор и осветление культуральной жидкости (обычно глубинная фильтрация, центрифугирование и/или микрофильтрация);

2) capture антител (protein-A-хроматография) – удаление HCP (остаточные белки продуцента) и ДНК;

3) вирусная инактивация при низком pH (также осаждаются HCP, но нужно учитывать стабильность продукта);

4) ионообменная хроматография как этап полишинга (для удаления агрегатов, эндотоксинов, нежелательных белков, вирусов);

5) концентрирование, перебуферирование (тангенциальная фильтрация);

6) ультра-, диа- и/или нанофильтрация для удаления оставшихся вирусов.

При этом требования нормативных актов (в первую очередь FDA) таково, что очистка от вирусов должна обеспечиваться введением в технологию как минимум двух ортогональных (базирующихся на различных принципах) методов, каждый из которых снижает содержание вирусов (лог вирусов) как минимум на два порядка [11, 12].

Рассмотрим ***вероятные источники вирусной контаминации*** (рисунок 1). Это может быть используемое сырье, включая технические газы (воздух, кислород, CO_2) и питательную среду, сам биореактор и, что наиболее вероятно, клеточная линия.

Рисунок 1. Вероятные источники вирусной опасности

Наилучшей методикой для снижения вирусной контаминации является предотвращение доступа случайных агентов в биореактор. Это достигается интенсивной проверкой клеточных линий, сырья (включая культуральные среды) на отсутствие вирусов. В общих чертах, производство сейчас отходит от использования добавок животного происхождения (например, сывороток, трансферринов, ростовых факторов). В частности, сыворотка КРР может быть заражена реовирусом, вирусом эпизоотической геморрагической болезни, везивирусом 2117, свиным трипсином – свиным цирковирусом, а другие компоненты сред – minute virus of mice (MVM). Во многих случаях при предварительном рутинном анализе сырья вирусы могут быть не обнаружены из-за недостаточной чувствительности методов, а также из-за того, что некоторые компоненты (антивирусные антитела) могут вызывать ингибирование.

Для обработки сырьевых материалов используются следующие методики, хотя они не являются обязательными:

– облучение γ-радиацией;

– инактивация UV-C;

– технология HTST (high temperature-shot time).

Опять же существует выход: использовать рекомбинантные или произведенные в растениях компоненты сред (трипсин, ростовые факторы).

Рассмотрим ***методы избавления от вирусов*** (рисунок 2). Эти методы можно разбить на две группы: инактивация вирусов и очистка от вирусов.

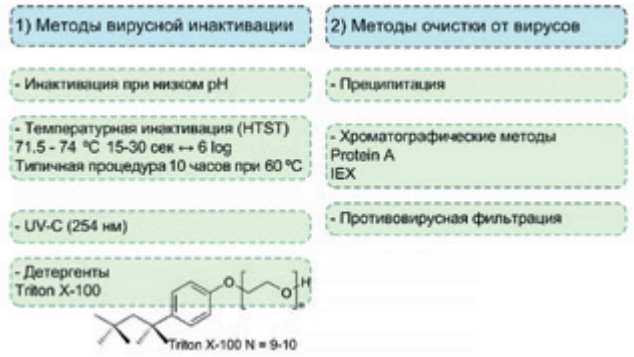

Рисунок 2. Методы избавления от вирусов

Вирусная инактивация

Может быть проведена за счет изменения pH (рисунок 3). В кислых условиях вирусы инактивируются, причем чем более низкий pH, тем лог инактивации вирусов ниже. Чем дольше время воздействия низкими pH, тем выше эффективность процесса. Некоторые вирусы при низком pH могут спонтанно денатурировать, таким образом, низкие значения pH можно использовать для вирусной инактивации тех белков, которые более устойчивы в данных условиях, чем вирусы. Данный метод эффективен в отношении вирусов с оболочкой (капсидом), для других вирусов его нужно совмещать с увеличением температуры. Как правило, типичными условиями pH-инактивации является выдерживание раствора белка при pH 4 в интервале от 6 ч до 21 дня.

Может быть проведена за счет жесткого облучения ультрафиолетом (рисунок 3), разрушающим

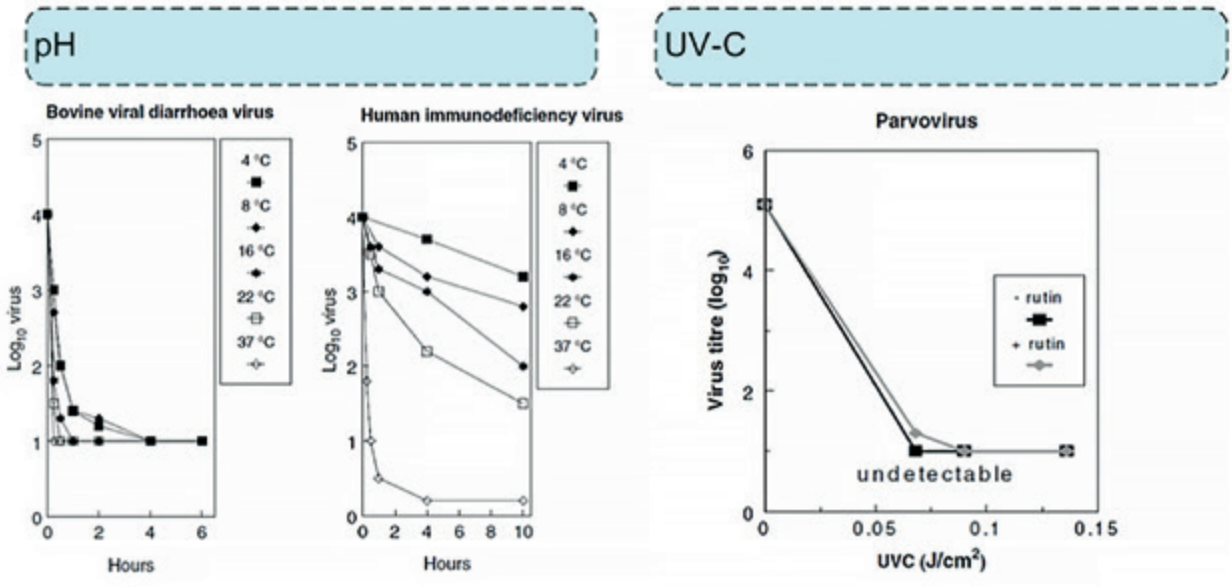

Рисунок 3. **pH- и УФ-инактивация вирусов**

генетический материал под капсидом вируса. УФ-лучи могут разрушать ДНК, приводя к образованию димеров нуклеиновых кислот. Этого практически не происходит в тканях, так как УФ-лучи плохо через них проникают, однако вирусные частицы малы и УФ-лучи могут достичь их генетического материала, разрушить ДНК, в результате чего вирус не может реплицироваться.

Инактивация детергентами. Эффективна только для вирусов с липидными оболочками, которые разрушаются под действием детергентов. Как правило, используется Тритон X-100, Tween-80.

Преципитация

Для преципитации вирусов используются органические растворители: этанол, TNBP и проч. Эффективна против капсидных и некапсидных вирусов, в частности против парвовируса B19. Типичный пример – многократная преципитация этанолом (рисунок 4).

Противовирусная нанофильтрация

Это самый эффективный и наиболее надежный метод. Фильтрация может быть только в тупиковом режиме (тангенциальный режим хотя на практике и возможен, запрещен по правилам GMP). Используются фильтры с диаметром пор 20 нм. Это связано со средним размером вирусных частиц. Кстати, самый маленький вирус – парвовирус – имеет размер 18–24 нм.

Ниже перечислены коммерчески доступные противовирусные фильтры (таблица 1). Фильтры для очистки от вирусов можно в общих чертах разделить на две категории:

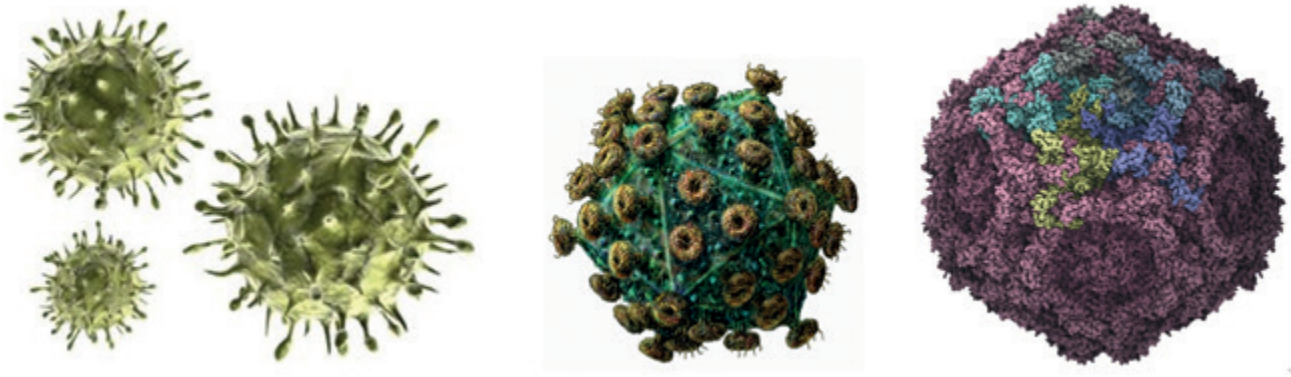

Рисунок 4. **Снижение лога для пяти различных вирусов на протяжении четырех этапов преципитации при производстве иммуноглобулина**

1) фильтры, которые обеспечивают >4 или >6 порядков снижения содержания больших вирусов, обычно это эндогенные ретровирусы размером 80–100 нм;

2) фильтры, которые обеспечивают >4 порядков снижения содержания маленьких и больших вирусов, имеющих больший размер, чем парвовирусы.

Таблица 1.

Наиболее известные противовирусные фильтры

Компания	Продукт	Virus Retention	Размер вирусов, нм
Asahi-Kasei	Planova 15N	> 6,2 log Parvovirus > 6,7 log Poliovirus	18–26 28–30
	Planova 20N	> 4,3 log Parvovirus > 5,4 log Encephalomyocarditis	18–26 28–30
	Planova 35N	> 5,9 log Bovine Viral Diarrhea virus > 7,3 log HIV	40–70 80–130
Millipore	Viresolve NFP	> 4,0 log φχ-174 bacteriophage	28
	Viresolve NFR	> 6,0 log Retrovirus	80–130
Pall	ULtipor DV20	> 3,0 log PP7 bacteriophage > 6,0 log RP772 bacteriophage	26 76–88
	ULtipor DV50	> 6,0 log RP772 bacteriophage	76–88
Sartorius	ViroSart CPV	> 4,0 log PP7 bacteriophage > 6,0 log Retrovirus	26 80–130

Парвовирусы имеют диаметр 18–24 нм, в то время как обычные моноклональные IgG-антитела имеют гидродинамический радиус 8–12 нм. Для достижения снижения содержания вирусов на 4 порядка и выхода белка более 99% у фильтров для очистки от парвовирусов должен быть очень узкий диапазон разброса размера пор. Поэтому они крайне чувствительны к присутствию различных примесей в растворе белка. Таким образом, при оптимизации процесса противовирусной фильтрации нужно учитывать большое число параметров.

Еще один интересный пример противовирусных фильтров – глубинные фильтры Zeta Plus™ VR, которые производитель рекомендует использовать на финальных этапах очистки продукта перед стерильным филлингом. Номинальный размер пор данных фильтров больше, чем самые маленькие животные вирусы, поэтому рабочим механизмом в данном случае является ионный обмен: на поверхности матрицы находится катионный модификатор, который обеспечивает электрокинетический захват вирусов в комбинации с адсорбцией. В данном случае ученые пытались очистить раствор моноклональных антител от xenotropic murine leukemia virus xMuLV (90нм) и Porcine Parvovirus (PPV 30нм) в 20мМ ацетатном буфере (pH 5.0). Результаты ниже (измеряемая величина – снижение на порядок) (рисунок 5).

Рисунок 5. Глубинные фильтры Zeta Plus™ VR

Хроматография

Однозначного рецепта использования хроматографии в качестве универсального средства избавления биофармацевтических продуктов от вирусов, к сожалению, нет. В теории ионообменная хроматография (причем как анионообменная – АОХ, так и катионообменная – КОХ) может снижать лог от двух до пяти за счет того, что вирусные капсиды имеют как положительные, так и отрицательные заряды [13]. Однако стоит отметить, что последовательное применение АОХ и КОХ не может, с точки зрения регуляторов, считаться использованием двух ортогональных методов.

Кроме того, вирусные капсиды, как и большая часть белков, имеют гидрофобные домены – вероятностно, что чем больше размер вирусной частицы, тем выше ее гидрофобность. Поэтому хроматография гидрофобных взаимодействий, а также обращенно-

фазовая хроматография позволяют снизить лог от четырех до семи.

Аффинная хроматография хотя гипотетически может снижать лог вирусов, не считается эффективным инструментом для избавления от вирусов.

Гель-фильтрация в теории может отделить целевую фракцию рекомбинантных белков от более крупных вирусных частиц. Однако биофармацевтические лекарственные молекулы, производимые в эукариотических культурах клеток, довольно большие – 8–12 нм. На практике разрешающей способности гель-фильтрационных сорбентов для эффективного отделения молекулы размером 8–12 нм от парвовируса диаметром 18–24 нм явно недостаточно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стратегия даунстрим-процесса выделения и очистки биофармацевтического лекарственного средства должна гарантировать вирусную безопасность, для чего в технологической схеме должно быть как минимум две ортогональные стадии эффективного избавления от вирусов. Схема, включающая в себя pH-инактивацию, вирусную фильтрацию и ионообменную хроматографию, позволит снизить гипотетическое вирусное загрязнение на 8-15 порядков. Схема, включающая преципитацию, ионообменную хроматографию и нанофильтрацию, снижает контаминацию на 11–16 порядков.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.В. Исеркапов, А.Л. Берковский, И.Д. Гурвиц, Н.С. Шастина, В.И. Швец. Изучение активации протромбинового комплекса для получения фактор-VIII-байпасной активности // Биофармацевтический журнал. 2014. Т. 6(5). С. 19–24.
2. Д.А. Гусаров, А.Ф. Миронов, В.И. Швец. Стратегия производственной технологии биофармацевтических лекарств // Биофармацевтический журнал. 2014. Т. 6(5). С. 25–37.
3. И.Е. Шохин, Т.А. Ярушок, Ю.В. Медведев, А.Ю. Савченко, Г.В. Раменская, Е.А. Малашенко. Биофармацевтическая классификация стратегически значимых лекарственных средств // Биофармацевтический журнал. 2015. Т. 7(5). С. 30-34.
4. K.M. Remington. Fundamental Strategies for Viral Clearance. Part 1: Exploring the Regulatory Implications // Bioproc. Int. 2015. V. 13(1). P. 10–16.
5. Д.А. Гусаров. Концепция биосинтеза терапевтических белков в клетках млекопитающих // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 4(13). С. 114–121.
6. Б.Б. Сысуев, Ю.С. Покровская. Рекомбинантные микроорганизмы и клеточные культуры в технологии получения препаратов белков // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 4(13). С. 96–109.
7. Note for Guidance on Validation of Virus Removal and Inactivation Procedures: Choice of Viruses EU 3AB9A, July 1995. URL: http://pharmacos.eudra.org/F2/eudralex/vol-3/pdfs-en/3ab9aen.pdf (дата обращения 20.01.2016).
8. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin ICH Q5A, March 1997, rev. September 1999. URL: www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html (дата обращения 20.01.2016).
9. Plasma-Derived Medicinal Products EU 3AB12A, rev 3, January 2001. URL: http://pharmacos.eudra.org/F2/eudralex/vol-3/pdfs-en/3ab12aen.pdf (дата обращения 20.01.2016).
10. Setting Standard of Quality and Safety of the Donation, Procurement, Testing, Processing, Preservation, Storage, and Distribution of Human Tissues and Cells. Directive 2004/23/EC, 31 March 2004. URL: http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2004/l_102/l_10220040407en00480058.pdf (дата обращения 20.01.2016).
11. Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use. FDA/CBER, February 1997. URL: www.fda.gov/cber/gdlns/ptc_mab.pdf (дата обращения 20.01.2016).
12. Guidance for Industry on Monoclonal Antibodies Used as Reagents in Drug Manufacturing. FDA/CDER, March 2001. URL: www.fda.gov/cder/guidance/3630fnl.htm (дата обращения 20.01.2016).
13. C. Scott. Methodologies for Viral Safety // Bioproc. Int. 2005. P. 30–38.