

ООО «Международный Биотехнологический центр «Генериум»

На правах рукописи



ЧАЩИНОВА Дарья Валентиновна

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ
РЕКОМБИНАНТНЫХ ТКАНЕВЫХ АКТИВАТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА**

1.5.6. Биотехнология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Кудлай Дмитрий Анатольевич

Москва – 2021

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Введение	13
1.2. Медицинское применение	15
1.3. Строение и физико-химические свойства ТАП и его рекомбинантных вариантов	19
1.4. Критические параметры качества рекомбинантных активаторов плазминогена.....	24
1.5. Современные подходы к разработке биоаналогов.....	25
1.6. Источники ТАП.....	28
1.7. Культивирование рТАП в клетках млекопитающих.....	31
1.8. Способы очистки ТАП	34
1.9. Получение тенектеплазы.....	42
1.10. Вирусная безопасность.....	43
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	47
2.1. Материалы и методы исследований	47
2.1.1. Схема исследования.....	47

2.1.2. Клеточная культура.....	47
2.1.3. Среды и добавки, использованные при культивировании	48
2.1.4. Реактивы и материалы, использованные при очистке ТАП.....	48
2.1.5. Расконсервация культуры клеток.....	49
2.1.6. Культивирование клеток в колбах Эрленмейера	49
2.1.7. Культивирование клона-продуцента алтеплазы в механическом биореакторе в режиме перфузии	50
2.1.8. Культивирование клона-продуцента тенекеплазы в механическом биореакторе в периодическом режиме	51
2.1.9. Глубинная фильтрация	53
2.1.10. Очистка алтеплазы, получение фармацевтической субстанции	53
2.1.11. Очистка тенекеплазы, получение фармацевтической субстанции	56
2.1.12. Определение содержания мономера ТАП методом геле-фильтрационной ВЭЖХ	58
2.1.13. Определение содержания двуцепочечной и одноцепочечной формы ТАП.....	59
2.1.14. Количественное определение остаточных белков клона-продуцента	59
2.1.15. Электрофорез белков в полиакриламидном геле.....	60
2.1.16. Определение концентрации белка.....	61
2.1.17. Определение активности целевого белка в субстанции готовой лекарственной формы методом лизиса фибринового сгустка	62
2.1.18. Фотометрическое определение активности ТАП	63
2.1.19. Измерение уровня глюкозы и лактата в культуральной жидкости	64
2.1.20. Определение pO_2 , pCO_2 , концентрации глутамина, глутамата, ионов аммония, калия и натрия	64
2.1.21. Определение концентрации и жизнеспособности клеток	64
2.1.22. Определение содержания сиаловых кислот в белках.....	65

2.1.23. Определение содержания ДНК методом ПЦР в реальном времени.	66
2.2. Результаты и обсуждение	69
2.2.1. Оценка критичности показателей качества разрабатываемых препаратов.....	69
2.2.2. Определение влияния изоформного состава на биологическую активность алтеплазы и тенектеплазы	73
2.2.3. Определение целевого профиля качества препаратов	77
2.2.4. Разработка технологии получения препарата алтеплазы	78
2.2.4.1. Отбор клонов-продуцентов алтеплазы	78
2.2.4.2. Разработка аналитической методики очистки алтеплазы.....	79
2.2.4.3. Разработка технологии непрерывного культивирования продуцента алтеплазы.....	87
2.2.4.4. Масштабирование технологии непрерывного культивирования продуцента алтеплазы.....	89
2.2.4.5. Разработка препаративной методики очистки алтеплазы	90
2.2.4.6. Масштабирование методики очистки алтеплазы	94
2.2.5. Разработка технологии получения препарата тенектеплазы.....	96
2.2.5.1. Отбор клонов-продуцентов тенектеплазы.....	96
2.2.5.2. Разработка аналитической методики очистки тенектеплазы	98
2.2.5.3. Разработка периодического метода культивирования тенектеплазы.....	101
2.2.5.4. Масштабирование периодического метода культивирования тенектеплазы.....	102
2.2.5.5. Разработка метода очистки тенектеплазы	104
2.2.5.6. Масштабирование методики очистки тенектеплазы.....	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	109

ВЫВОДЫ	110
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ...	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	112

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ТАП – тканевой активатор плазминогена
- ТЭЛА – тромбоэмболия легочных артерий
- ЧКВ – чрескожное коронарное вмешательство
- ДЦ – двуцепочечная форма ТАП
- ОЦ – одноцепочечная форма ТАП
- ВДИ – вода для инъекций
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГФ – гель-фильтрация
- ГЛФ – готовая лекарственная форма
- ИФА – иммуноферментный анализ
- КЖ – культуральная жидкость
- КИ – клинические исследования
- FDA – Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов
- NINDS – National Institute of Neurological Disorders and Stroke, Национальный Институт Неврологических Заболеваний (США)
- PAI-I – Plasminogen activator inhibitor-1, ингибитор активатора плазминогена первого типа
- EMA – European Medicines Agency, Европейское агентство лекарственных средств
- tPA – Tissue plasminogen activator, тканевой активатор плазминогена
- TNK-tPA – tenecteplase, тенектеплаза
- CV – column volume, объем колонки
- qPCR – quantitative polymerase chain reaction, real-time polymerase chain reaction, полимеразная цепная реакция в реальном времени

NANA – N-acetylneuraminic acid, N-Ацетилнейраминовая кислота, наиболее распространенная сиаловая кислота

TNBP – tri(n-butyl)phosphate, трибутилфосфат

CHO – Chinese hamster ovary cells – клетки яичника китайского хомячка

SDS-PAGE – sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis – электрофорез белков в полиакриламидом геле в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

В терапии неотложных состояний, вызванных тромбообразованием, важное место занимает терапия тканевыми активаторами плазминогена (ТАП) [1]. На данный момент алтеплаза (полноразмерный ТАП) и тенектеплаза (мутантный ТАП с увеличенным сродством к фибрину) являются основными фибринолитическими препаратами, рекомендованными Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA, United States Food and Drug Administration (FDA) [2, 3]. Алтеплаза входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2019 год, утвержденный Правительством РФ [4].

ТАП имеет сложно организованную мультидоменную структуру [5] и три сайта N-гликозилирования [6], содержащие разветвленные гликаны различной структуры, что обуславливает высокую степень полиморфизма молекул ТАП. Варианты гликозилирования ТАП могут обладать значительно отличающейся фармакодинамикой и биологической активностью, что может стать причиной неудачи биотехнологической разработки [7]. Высокая степень полиморфизма молекул определяет широкий спектр критических параметров качества препарата, требующих пристального внимания при биотехнологической разработке. ТАП склонен к агрегации в водных растворах [8], что значительно затрудняет разработку процессов очистки препарата. Описанные в литературе методы очистки алтеплазы и тенектеплазы отличаются сложностью и плохой масштабируемостью.

Создание современной технологии производства фибринолитических препаратов – биоаналогов алтеплазы и тенектеплазы – в России является актуальной проблемой. При разработке технологии получения биоаналогичных препаратов должна быть достигнута эквивалентность с оригинальным препаратом по критическим параметрам качества, безопасности, эффективности.

Достижение цели будет обеспечено благодаря использованию современных методов культивирования и очистки препаратов. Получаемые продукты будут соответствовать современным требованиям безопасности.

Степень разработанности проблемы

Единственным производителем алтеплазы (торговое наименование Актилизе) и теноктеплазы (торговое наименование Метализе) является компания Берингер Ингельхайм (Boehringer Ingelheim). Продуцент алтеплазы культивируется производителем в периодическом режиме в биореакторах большого объема [9]. Информация по способу культивирования продуцента теноктеплазы производителем не публиковалась. Единственная на данный момент попытка создания биоаналога теноктеплазы, лекарственного препарата Элаксим, осуществлена индийской компанией Emcure Pharmaceuticals LTD. Однако активность полученного биоаналога оказалась значительно ниже активности референтного препарата [7]. На момент начала работ технология производства препаратов рекомбинантных тканевых активаторов плазминогена в России отсутствовала.

Цель и задачи исследований

Целью данного исследования являлась разработка технологии получения фибринолитических препаратов рекомбинантного тканевого активатора плазминогена алтеплазы и его мутантной формы теноктеплазы.

Для достижения цели исследования поставлены следующие задачи:

1. Разработать условия суспензионного культивирования клеток СНО - продуцентов алтеплазы и теноктеплазы.
2. Разработать условия хроматографической очистки алтеплазы и теноктеплазы для получения препаратов качества, пригодного для медицинского использования.

3. Масштабировать технологию культивирования продуцента и хроматографической очистки алтеплазы и тенектеплазы до промышленного уровня.

Научная новизна

Разработаны новые технологии культивирования продуцентов алтеплазы и тенектеплазы. Впервые разработан способ получения высококачественного препарата алтеплазы путем использования непрерывного суспензионного культивирования клеток СНО с внешним перфузионным устройством. Впервые научно обоснованы параметры процесса периодического культивирования продуцента тенектеплазы, обеспечивающие наибольшую продуктивность в сочетании с достижением критических параметров качества.

Разработаны новые технологии хроматографической очистки алтеплазы и тенектеплазы. Технология очистки алтеплазы на основе нового аффинного сорбента защищена патентом № RU2683950C1 на изобретение «Метод получения рекомбинантного ТАП для медицинского применения».

Практическая значимость

На основании результатов исследований была создана технология получения препаратов ТАП и создан полный цикл производства субстанций ферментных тромболитических препаратов. В настоящий момент препарат алтеплазы зарегистрирован (ЛП-005158), препарат тенектеплазы находится в стадии клинических исследований (РКИ №712 (16.12.2019)).

Создание новой технологии получения препаратов ТАП позволит повысить доступность тромболитической терапии для пациентов и снизит зависимость от импорта лекарственных средств.

Личный вклад соискателя

Автор принимала активное участие в постановке целей и задач исследования. Автор разработала план исследования и стратегию контроля качества получаемых препаратов, принимала активное участие в работах по разработке технологий культивирования продуцентов.

Автором совместно с сотрудниками лаборатории пилотного культивирования (руководитель к.б.н. Баньковский Д.О.) и отдела разработки процессов (руководитель к.б.н. Морозов А. Н) компании «ГЕНЕРИУМ» были выполнены работы по разработке и оптимизации технологий культивирования продуцентов алтеплазы и тенектеплазы.

Совместно с начальником Управления экспериментального производства АО «ГЕНЕРИУМ». к.х.н. Стратоновой Н.В. автором выполнен перенос технологий культивирования продуцентов и очистки препаратов алтеплазы и тенектеплазы на производственную площадку АО «ГЕНЕРИУМ».

Автор совместно с компанией Thermo Fisher Scientific и н.с. Вассарайсом Р.А. участвовала в создании аффинного сорбента для ТАП CaptureSelect tPA. Автор совместно с н.с. Вассарайсом Р.А. и н.с., к.х.н. Смоловой К.А. выполняла работы по разработке аналитических и препаративных методик очистки алтеплазы и тенектеплазы.

Автор проводила анализ полученных данных и интерпретировала результаты. Также автором лично или при ее непосредственном участии подготовлены к публикации статьи по материалам исследований.

Апробация результатов диссертации

Основные результаты исследований доложены на межлабораторном семинаре сотрудников МБЦ «ГЕНЕРИУМ», совещании сотрудников МБЦ и АО «ГЕНЕРИУМ», научно-практических конференциях «Биофармацевтика на Барском Лугу 2019» и «Биофармацевтика на Барском Лугу 2017»

Публикации

По результатам диссертации опубликовано 6 работ, в том числе 4 статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК и включенных в международные базы цитирования, зарегистрирован один патент.

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения; обзора литературы; описания собственных исследований: материалов и методов исследований, результатов исследований; обсуждения полученных результатов; выводов; рекомендаций по использованию научных выводов; списка литературы. Работа изложена на 130 страницах, включая 23 рисунка и 14 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 150 источников, в том числе 8 на русском языке.

Основные положения и результаты, выносимые на защиту:

Разработана технология получения алтеплазы, состоящая из непрерывного суспензионного культивирования продуцента в биореакторе с внешним перфузионным устройством и способа хроматографической очистки алтеплазы, основанного на применении нового аффинного сорбента, позволяющая получать препаративные количества активного препарата.

2. Разработана технология получения тенектеплазы, состоящая из периодического суспензионного культивирования продуцента и способа хроматографической очистки тенектеплазы, основанного на применении гидрофобной и псевдоаффинной хроматографии, позволяющая получать препаративные количества активного препарата

3. Получены активные препараты алтеплазы и тенектеплазы с содержанием мономера более 96%, одноцепочечной формы более 60%, примесных белков менее 67 нг/мл для тенектеплазы, менее 12,1 нг/мг для алтеплазы, примесной ДНК менее 10 пг/мг.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Введение

Активаторы плазминогена – ферменты, участвующие в регуляции системы свертывания крови, часть фибринолитического каскада. Активаторы плазминогена способствуют растворению тромбов и участвуют в миграции клеток и ремоделировании тканей. Тканевой активатор плазминогена (ТАП, tPA, алтеплаза) секретируется клетками эндотелия сосудов, и, являясь сериновой протеазой, расщепляет профермент плазминоген, переводя его в активную форму – плазмин. Активированный плазмин лизирует связующую основу тромба – фибрин – и способствует растворению тромба. ТАП препятствует избыточному тромбообразованию и способствует лизису уже образовавшихся тромбов. Терапия активаторами плазминогена занимает важное место в лечении неотложных состояний, вызванных тромбообразованием. Для тромболиза применяют как нативный человеческий ТАП, так и его мутантные варианты с измененной активностью и временем жизни в организме: тенектеплазу и ретеплазу.

По данным ВОЗ, заболевания, связанные с патологическим тромбообразованием (инфаркт миокарда, ишемический инсульт, легочная тромбоэмболия (ТЭЛА)) являются одной из ведущих причин смерти [10]. В России заболеваемость острым инфарктом миокарда составляет 140 случаев на 100 000 [11], инсультом – от 460 до 560 случаев на 100000 населения, ТЭЛА – 100 на 100000 человек [12].

В настоящее время предпочтительным способом лечения при остром инфаркте миокарда является первичное чрескожное коронарное вмешательство (ЧКВ) со стентированием инфаркт-связанной коронарной артерии. ЧКВ может быть выполнено в первые 12 ч от начала заболевания и в первые 90 мин от момента первого врачебного контакта. При невозможности проведения операции ЧКВ или в виде дополнения к данной процедуре предпочтительным методом лечения является тромболизис при помощи активаторов плазминогена. Наилучшие

результаты реканализации наблюдаются при проведении тромболизиса в течение 2 часов с момента возникновения инфаркта, эффективное применение тромболитиков возможно в течение 12-24 ч. На данный момент алтеплаза и тенектеплаза (рекомбинантный ТАП с точечными изменениями первичной последовательности и модифицированным гликозилированием) являются основными фибринолитическими препаратами, рекомендованными Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA, US Food and Drug Administration) для терапии острого инфаркта миокарда, ишемического инсульта и массивной ТЭЛА. Алтеплаза и тенектеплаза входят в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2020 год, утвержденный Правительством РФ. Перспективно также применение ТАП при катетер-ассоциированном тромбозе, ДВС-синдроме, плевральных спайках вследствие легочных инфекций (совместно с ДНКазой I типа). В 2010 г. алтеплаза в числе одного из 57 лекарств была включена в «Перечень стратегически значимых лекарственных средств, производство которых должно быть обеспечено на территории Российской Федерации». Выпуск препаратов на основе ТАП включен в государственную стратегическую программу развития фармацевтической промышленности Российской Федерации [13, 14].

В медицинской практике России применяется препарат алтеплазы под коммерческим названием Актилизе, выпускаемый немецкой фармацевтической компанией Boehringer Ingelheim. В начале выпуска препарата на мировой рынок в конце 90-х цена за флакон (50 мг) составляла 1100 \$ [15]; на сегодняшний день цена в России варьируется в пределах 18–27 тыс. рублей за флакон [16]. В 2008 году данный препарат был закуплен на сумму более чем 20 млн долларов США.

Потребность в препаратах ТАП в России составляет 60 кг в год (количество получено путем прямого подсчета исходя из статистики заболеваемости), также критично их наличие в лечебных учреждениях и укладках скорой помощи ввиду узкого терапевтического окна, однако обеспеченность современными фибринолитическими препаратами крайне низка.

1.2. Медицинское применение

Модель физиологического каскада фибринолиза, впервые представленная на VII Международном Конгрессе по Тромбозу и Гемостазу (Лондон, 1979 год) [17], раскрыла специфичность ТАП к фибрину, пробудив интерес к потенциальному использованию ТАП в качестве тромболитического агента, как альтернативы к неспецифическим активаторам плазминогена, доступным в те годы (стрептокиназа, урокиназа). Фибринолитические препараты первого поколения, стрептокиназа и урокиназа, обладали неспецифическим тромболитическим эффектом и активировали плазминоген независимо от присутствия фибрина тромба. В отличие от них, тромболитические агенты второго (алтеплаза) и третьего (тенектеплаза, ретеплаза) поколения активируют плазминоген только связавшись с фибрином тромба, что способствует уменьшению количества и частоты осложнений такой терапии.

Терапевтический потенциал ТАП исследовали с начала 1980-х годов, этот процесс был непосредственно связан с поиском пути получения ТАП в количествах, достаточных для медицинского применения. Впервые рекомбинантный ТАП был получен в 1983 [18], с 1984 начаты клинические испытания [19]. Одобрение FDA для применения алтеплазы при остром ишемическом инфаркте миокарда получено в 1987 году [20]. Позднее получено одобрение для использования алтеплазы при ишемическом инсульте и ТЭЛА. Тенектеплаза, вариант человеческого ТАП, в котором произведены три точечные мутации для увеличения сродства к фибрину и времени жизни в кровотоке, разработана в 1999 году [21], получила одобрение FDA для использования при инфаркте миокарда в 2000 году [2].

Изучению эффективности и безопасности тромболитического действия алтеплазы были посвящены восемь крупных рандомизированных контролируемых исследований, в которых при проведении терапии алтеплазой наблюдалось

значительное сокращение доли пациентов с неблагоприятными функциональными исходами, однако оптимальное терапевтическое окно для тромболизиса алтеплазой составляло 3–3,5 часа от появления симптомов [22]. Препараты на ее основе обладают малым системным фибринолитическим эффектом, что существенно снижает риск развития генерализованных геморрагических осложнений [23].

Впервые эффективный тромболизис с помощью ТАП, полученной из культуры клеток меланомы, был продемонстрирован в 1980 году на модели легочной тромбоэмболии у кроликов [24]. В 1981 году на собаках была продемонстрирована эффективность ТАП при остром инфаркте миокарда: внутривенная инфузия ТАП способствовала быстрой реканализации коронарных артерий и не вызывала системной активации фибринолитической системы [25]. Впоследствии эти исследования были успешно повторены с рекомбинантным ТАП [26].

Первая клиническая апробация ТАП, полученной из культуры клеток меланомы Bowes, на пациентах с острым инфарктом миокарда была проведена в 1983 году [27]. После одобрения FDA рекомбинантный ТАП был исследован в рамках многоцентрового рандомизированного клинического исследования в 1984 году. В этом исследовании пациенты получали рекомбинантный ТАП, полученный компанией Genentech, в дозировке 0,5 мг/кг веса в течение 60 минут; восстановление кровотока наступало в 75% случаев. Системный фибринолиз отсутствовал или не представлял опасности для жизни пациентов. Эти первоначальные исследования стали основой для множества других клинических исследований, показавших возможности и ограничения тромболитической терапии инфаркта с помощью ТАП [19, 28-30].

Наилучшие результаты реканализации наблюдаются при проведении тромболизиса в течение 2 часов с момента возникновения инфаркта, реканализация проходит менее эффективно при применении тромболитиков в течение 12-24 ч, при этом рекомендуется постепенное внутривенное инфузионное введение препарата алтеплазы в течение одного—полутора часов в дозировке до 0,9 мг/кг веса.

Тромболизис не рекомендован, если пациент доставлен в госпиталь позднее 24 часов с момента наступления инфаркта [31].

К настоящему времени по всему миру проведено множество клинических исследований, посвященных тромболизису при помощи теноктеплазы, которые показали эффективность данного препарата при введении в течение первых 12 часов от появления симптомов инфаркта. Преимуществами теноктеплазы перед другими тромболитиками, включая алтеплазу, являются удобство использования (требуется однократное внутривенное введение в дозировке 0,5 мг/кг веса), пониженный риск кровотечений, хорошие показатели реканализации, особенно при раннем введении [32].

В настоящее время предпочтительным методом терапии при остром инфаркте миокарда является баллонная коронарная ангиопластика. Тромболизис, в том числе при помощи теноктеплазы, несколько менее эффективен, но является вмешательством первой линии выбора при экстренной помощи или в виде дополнения к ангиопластике [33].

Сейчас алтеплаза наиболее широко используется при ишемическом инсульте. Путь к использованию алтеплазы при лечении пациентов с острым ишемическим инсультом был долг и сложен. Одобрение FDA для использования алтеплазы при ишемическом инсульте было получено только в 1996 году, после опубликования Национальным Институтом Неврологических Заболеваний (NINDS) результатов клинических исследований, в которых пациенты, получавшие 0,9 мг/кг алтеплазы не позднее 3 часов после обнаружения симптомов инсульта, показали на 30% больше благоприятных исходов, чем группа, получавшая плацебо. В то же время вероятность возникновения геморрагического инсульта в группе, получавшей ТАП, была выше, чем в группе, получавшей плацебо (6,4% против 0,6%) [34]. После этого терапевтическое применение алтеплазы при ишемическом инсульте изучалось в еще одиннадцати крупных клинических исследованиях. Мета-анализ этих исследований показал, что введение алтеплазы в течение первых шести часов после инсульта существенно повышает выживаемость и уменьшает возможные

негативные последствия инсульта. Эффект особенно заметен при введении алтеплазы в течение первых трех часов после инсульта. Одновременно с этим наблюдалось повышение частоты смертности пациентов от внутричерепных кровоизлияний в течение семи дней после тромболизисной терапии [35]. Было высказано предположение, что алтеплазу следует вводить как можно раньше после появления симптомов инсульта [35, 36]. Во многих национальных руководствах и протоколах оказания помощи применение алтеплазы рекомендовано для ограниченных групп пациентов и в ограниченных временных рамках. Руководства рекомендуют внутривенное введение препаратов алтеплазы в течение первых 3 или 4,5 часов после инсульта. При введении алтеплазы в более поздние периоды риски осложнений превосходят возможные преимущества [37]. Вопрос пользы от применения алтеплазы при остром ишемическом инсульте и в настоящее время остается дискуссионным. Мета-анализ 12 клинических исследований, проведенный исследовательской группой The NNT, не выявил преимуществ использования алтеплазы [38], но в то же время некоторые авторы считают, что эффективность алтеплазы недооценена, а рамки ее применения неоправданно узки [3, 35, 39].

Клинические исследования, оценивающие возможность тромболизиса при помощи тенектеплазы при ишемическом инсульте показали, что эффективность и безопасность применения тенектеплазы при инсульте ограничены. Уровень реканализации и степень раннего улучшения самочувствия пациентов были выше, чем в случае использования алтеплазы, однако значимых различий в степени восстановления самостоятельности и улучшении функций мозга, а также различий в частоте кровотечений и смерти пациентов при применении алтеплазы и тенектеплазы обнаружено не было. Таким образом, можно сделать вывод, что алтеплаза и тенектеплаза могут применяться при ишемическом инсульте со сравнимой эффективностью [40] [41] [42]. Однако разрешение FDA на применение тенектеплазы при ишемическом инсульте до сих пор не получено.

Применение тромболитических препаратов при легочной тромбоэмболии разумно только в случаях массивной ТЭЛА, вызывающей кардиогенный шок и падение кровяного давления. Применение алтеплазы при острой массивной ТЭЛА с нестабильной гемодинамикой одобрено FDA в 2002 году. При этом желательно не системное введение тромболитиков, а доставка в легкие при помощи катетера, установленного в легочную артерию [43]. Применение алтеплазы и тенектеплазы при субмассивной тромбоэмболии со стабильной гемодинамикой как легких, так и нижних конечностей, не желательно, так как не увеличивает существенно процент положительных исходов, но повышает вероятность кровотечений, геморрагического инсульта и смерти пациента [44]. В таких случаях, как правило, применяется антикоагуляционная терапия (гепарин, варфарин)[45].

Другие сферы перспективного применения фибринолитических препаратов включают в себя обморожения, субмакулярные кровоизлияния, обработку центрального венозного катетера, гнойные осложнения заболеваний легких, постоперационный период перитонита [1].

Всего на сегодняшний день около 300 000 пациентов в год получают рекомбинантный ТАП [22].

1.3. Строение и физико-химические свойства ТАП и его рекомбинантных вариантов

Секретируемый человеческий ТАП представляет собой гликопротеид массой около 70 кДа, состоящий из 527 аминокислот. Молекула-предшественник природного ТАП имеет также сигнальную последовательность на N-конце, сходную с таковой у сывороточного альбумина [46]. Сигнальная последовательность необходима для секреции ТАП [47] и имеет длину 32-35 аминокислотных остатков (сигнальная пептидаза отрезает последовательность после Arg32 (реже) или Arg35 (чаще), создавая N-терминальную гетерогенность в популяции зрелых молекул ТАП, которые таким образом могут начинаться с Ser1 или Gly-3[48].

ТАП имеет сложно организованную пространственную структуру и состоит из пяти доменов четырех типов: фибронектиновый фингер-домен, EGF-подобный домен, два крингл-домена и трипсиноподобный протеолитический домен (Рисунок 1) [5].



Рисунок 1 – Схема строения алтеплазы и тенектеплазы. 1 – Фингер-домен, 2 – EGF-подобный домен, 3,4 – крингл-домены, 5 – протеолитический домен. Кругами обозначены сайты гликозилирования.

В N-терминальной области полипептидной цепи расположен F-, фингер- или фибронектиновый домен (аминокислотные остатки 4-50), гомологичный фингер-домену фибронектина, и ответственный за аффинное связывание молекулы с фибрином [49]. В тканях мозга фингер-домен, взаимодействуя с липопротеинами низкой плотности, позволяет ТАП преодолевать гематоэнцефалический барьер [50].

Остатки 50-87 формируют домен, гомологичный эпителиальному фактору роста, называемый также E-доменом или EGF-подобным доменом. Аналогичная

структура присутствует также у родственной ТАП урокиназы и в факторе свертывания X [51]. EGF-подобный домен взаимодействует с предшественниками олигодендроцитов и способствует их миграции в тканях мозга.

Остатки 87-176 и 176-256 формируют соответственно крингл-1 и крингл-2 домены, высокогомологичные друг другу и крингл-доменам протромбина, плазминогена и урокиназы. В общем представлении крингл-домены отвечают за связывание фибрина, но исследования [47] показали, что только домен крингл-2 активно связывает фибрин, в то время как крингл-1 практически не участвует в этом процессе. Стехиометрический коэффициент связывания составляет примерно 1 моль ТАП на 1 моль мономера фибрина [52]. Константа диссоциации составляет приблизительно 0,6. Крингл-2 домен содержит также сайт связывания лизина с константой диссоциации около 100. Эксперименты с использованием метода равновесного диализа показали, что в этом взаимодействии важную роль играет заряд ϵ -аминогруппы [53].

Аминокислотные остатки 276–527 формируют протеолитический домен ТАП, отвечающий за ферментативную активность. Протеолитический домен представляет собой сериновую протеазу, активный сайт которой сформирован боковыми радикалами His322, Asp371, и Ser478. Содержащаяся в этом домене структура Lys296-His-Arg-Arg299 обеспечивает быстрое ингибирование ферментативной активности ТАП физиологическим ингибитором PAI-1 [54]. Области, регулирующие активность и время жизни ТАП *in vivo* (начальное время полужизни составляет 6 минут), расположены также на фингер- и E-доменах и в боковых углеводных цепях.

На участке, соединяющем крингл-2 и протеолитический домены между аминокислотными остатками Arg275 и Pe276 расположена пептидная связь, особенно склонная к расщеплению. В результате реакции образуются два фрагмента: N-концевая тяжелая цепь, куда входят первые 276 аминокислотных остатков и C-концевая легкая цепь из 251 аминокислотных остатков. Две цепи связаны между собой одним дисульфидным мостиком, образованным Cys264 и

Cys395. Расщепленную молекулу обычно называют "двухцепочечной" (ДЦ) в отличие от интактной "одноцепочечной" (ОЦ) формы. Одноцепочечный ТАП каталитически менее активен по отношению к низкомолекулярным субстратам, чем двухцепочечная форма [55], но их активности в отношении плазминогена сопоставимы [56].

Зрелый белок содержит 35 цистеинов, 34 из которых принимают участие в формировании 17 дисульфидных связей, со свободным цистеиновым остатком в позиции 83 [22].

ТАП имеет четыре потенциальных сайта N-гликозилирования, имеющих консенсусную последовательность Asn-X-Ser/Thr (Asn117, Asn184, Asn218, и Asn448), три из которых гликозилируются различным образом (позиция Asn218 не гликозилируется) (Рисунок 1). Продуцируемая клетками меланомы и СНО алтеплаза существует в двух типах гликозилирования. Тип II имеет высокоманнозную цепь в положении 117 и сложный олигосахаридный комплекс в положении 448. Тип I в дополнение к олигосахаридам формы II содержит олигосахаридный комплекс в положении 184 [57]. К галактозным остаткам олигосахаридных цепей связью α -2,3 присоединены сиаловые кислоты. Функциональные различия между I и II типом гликозилирования заключаются в различной аффинности к фибрину (тип II обладает более высокой аффинностью) [58]. Терапевтические препараты ТАП содержат смесь примерно равных долей обоих типов гликозилирования. Углеводные комплексы составляют 5-7% массы нативного белка [59].

Негликозилированная алтеплаза, экспрессированная в *E. coli*, и дегликозилированная алтеплаза сохраняют свою специфическую активность [18] [60], однако число сайтов гликозилирования и состав сахаров *in vivo* оказывают влияние как на специфическую активность ТАП, так и на его время жизни. Обработка ТАП нейраминидазой, β -галактозидазой, α -маннозидазой повышает активность ТАП [61]. Алтеплаза способна к связыванию с маннозным рецептором

эндотелиальных клеток печени, где эндоцитируется и метаболизируется гепатоцитами [62].

Тенектеплаза представляет собой вариант ТАП, в котором для увеличения сродства к фибрину и увеличения времени жизни в кровотоке произведены три биоинженерные мутации: замена аминокислоты Thr103 на Asp103 с образованием нового сайта гликозилирования, замена аминокислоты Asp117 на Gln 117 для удаления высокоманнозного сайта гликозилирования, замена аминокислот Lys-His-Arg-Arg (296–299) на Ala-Ala-Ala-Ala (296–299) для уменьшения сродства к физиологическому ингибитору PAI-I [63].

За счет описанных мутаций получены следующие преимущества тенектеплазы по сравнению с алтеплазой: в 14 большее сродство к фибрину, что обеспечивает низкий риск кровотечений, большее время полувыведения – 18 мин против 4 мин, в 80 раз большая устойчивость к ингибитору активатора пламиногена PAI-1 [64]. Гликозилирование является основным источником гетерогенности тенектеплазы. Так же, как и алтеплаза, тенектеплаза имеет гликоформы I и II типа. Тип I имеет три гликоцепи в положениях Asp103, Asp184, Asp448, тогда как тип II лишен гликоцепи в положении Asp184 [6]. Однако, в отличие от алтеплазы, все гликоцепи тенектеплазы комплексные, а высокоманнозные структуры отсутствуют, что предупреждает расщепление тенектеплазы клетками печени [65]. Специфический паттерн гликозилирования зависит от экспрессионной системы, штамма-продуцента, а также от многих аспектов производственного процесса [66].

Углеводная составляющая молекулы ТАП оказывает значительное влияние на растворимость белка. Растворимость алтеплазы в водных растворах невелика, и в отсутствие стабилизирующих агентов не превышает 1 мг/мл. При значениях pH 6–8 в растворимой форме можно обнаружить практически только алтеплазу I типа гликозилирования. Алтеплаза II типа в отсутствие стабилизирующих агентов растворима только при pH менее 5 [8].

Лизин, его производные, ϵ -аминокапроновая кислота, глицил-глицин, аргинин и орнитин, связывающиеся с крингл-2 доменом, повышают растворимость ТАП. Заметный эффект аргинина на растворимость ТАП проявляется только при концентрации выше 100 мМ, при этом растворимость ТАП I типа достигает 30 мг/мл. Однако, растворимость ТАП II типа гликозилирования не превышает 20 мг/мл даже при концентрации аргинина 200 мМ [8].

ТАП склонен к агрегации и адгезии на стенках стеклянной посуды. Избежать этого позволяет добавление сурфактантов, в частности полисорбата 80 [67], [68].

По данным, получаемым при обработке аминокислотной последовательности ТАП в программе ExPasy ProtParam, pI белка составляет 7,61; коэффициент экстинкции Abs 0.1% (=1 g/l) составляет 1,817–1,853; индекс нестабильности – 45,37, что характеризует белок как нестабильный [69].

1.4. Критические параметры качества рекомбинантных активаторов плазминогена

Для препаратов, включенных в Фармакопею, необходимым является соответствие параметрам и способам контроля, описанным в соответствующей частной фармакопейной статье.

Препарат алтеплазы внесен в Европейскую Фармакопею и имеет ряд фиксированных Фармакопеей параметров. Согласно Европейской Фармакопее 9.0 следующие показатели определяют подлинность и качество препарата алтеплазы: биологическая активность, первичная последовательность, паттерн полос при проведении изоэлектрического фокусирования, содержание одноцепочечной формы, мономера, I/II типа гликозилирования, бактериальных эндотоксинов, нейтральных сахаров, сиаловых кислот [70]. Из вышеперечисленных наиболее критичными для создания биоэквивалентного препарата являются параметры, влияющие на биологическую функцию препарата и его фармакокинетику: фибринолитическая активность, содержание ОЦ формы, мономера, сиаловых кислот.

Факторы, принимаемые во внимание при оценке схожести препаратов (согласно рекомендациям FDA 2015), также включают в себя тип экспрессионной системы, процесс производства, оценку физико-химических свойств, функциональной активности, характеризацию примесей, сравнение с оригинальным препаратом и (при наличии) международным стандартом, стабильность при хранении.

Общими требованиями для препаратов с внутривенным введением являются минимальное содержание СНО, ДНК, вирусная безопасность препарата.

Тенектеплаза является веществом того же класса, что и алтеплаза, и к ней применимы те же критические параметры за очевидным исключением первичной последовательности и некоторых особенностей гликозилирования. Ввиду отсутствия международного стандарта тенектеплазы, для разработки препарата, биоаналогичного Метализе, производители вправе использовать сравнение с оригинальным препаратом в соответствии с требованиями регуляторных органов страны-производителя и стран, в которых будет производиться реализация биоаналогичного препарата.

1.5. Современные подходы к разработке биоаналогов

Определение биологически подобного лекарственного препарата (биоаналога) дается в директиве Евросоюза 2003/63/ЕС [71] и в Федеральном Законе «Об обращении лекарственных средств» [72]. Согласно этим документам, биоаналог — это биотехнологическое лекарственное средство, схожее с произведенным впервые оригинальным лекарственным средством по параметрам качества, эффективности и безопасности, представленное в такой же лекарственной форме и имеющее идентичный способ введения, и представленное на регистрацию после истечения срока действия патента оригинального (референтного) препарата.

Биологически подобные лекарственные препараты близки к группе дженериков. Дженерики – лекарственные средств, химически идентичные

оригиналу. С помощью методов современного химического анализа идентичность молекулы дженерика молекуле оригинального препарата может быть проверена очень высокой точностью. Для регистрации таких препаратов достаточно доказать идентичность действующего вещества и провести фармакокинетические исследования.

Считается, что дженерики могут быть произведены только для малых молекул. Но на данный момент около половины всех разрабатываемых в мире препаратов — это биотехнологические лекарственные средства. Биотехнологические лекарственные средства, по определению ЕМА, это лекарственные средства, произведенные путем биотехнологических процессов с применением: технологии рекомбинантной ДНК; метода контролируемой экспрессии генов, кодирующих выработку биологически активных белков; метода гибридомы и моноклональных антител. Биотехнологические препараты имеют очень сложную структуру молекулы действующего вещества. Чаще всего это белок, имеющий высокую молекулярную массу и уникальную пространственную структуру, которая формируется в процессе многостадийного внутриклеточного синтеза и зависит не только от аминокислотной последовательности полипептида, но и от посттрансляционных модификаций, например, гликозилирования. Пространственная структура молекулы, количество окисленных производных или паттерн гликозилирования могут существенно меняться при самых незначительных модификациях технологического процесса. На сегодняшний день не существует таких аналитических методик, которые позволяли бы оценить все свойства белков в воспроизведенных биомедицинских лекарственных препаратах и на подтвердить их полную идентичность белкам, которые находятся в составе оригинальных препаратов. Так как для биотехнологических препаратов производство полностью идентичного аналога затруднительно, в этом случае для воспроизведенного препарата применяется термин биоаналог. В достаточной степени оценить различия эффективности и безопасности между оригинальными биотехнологическими препаратами и биоаналогами можно только в ходе

клинических испытаний. Последствия изменения структуры действующего вещества для пациентов могут как отсутствовать, так и быть очень серьезными — от возникновения аллергических реакций до снижения эффективности препарата.

ЕМА разработало жесткие требования к регистрации биологически подобных лекарственных препаратов [73]. Для получения регистрации биоаналогов, согласно этим требованиям, необходимо провести практически такой же объем исследований, как и для оригинального препарата. Производитель должен доказать, что эффективность, безопасность и иммуногенность препарата сравнимы с показателями оригинального препарата.

До вступления в силу Федерального закона N 429-ФЗ от 22 декабря 2014 года в российском законодательстве понятие биоаналога отсутствовало, и подобные препараты регистрировались по упрощенной процедуре, аналогичной процедуре регистрации дженериков.

Согласно Федеральному закону Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. N 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» в редакции Федерального закона от 22.12.2014 № 429-ФЗ, ускоренная процедура экспертизы лекарственных средств в целях государственной регистрации лекарственных препаратов для биоаналоговых лекарственных препаратов не применяется.

В связи с тем, что государственные расходы на здравоохранение во многих странах ограничены, в настоящее время внимание к использованию биоаналогов оригинальных препаратов усилилось [74]. Даже в промышленно развитых странах применение воспроизведенных препаратов стимулируется на государственном уровне при обязательном соблюдении патентных прав производителей оригинальных препаратов. Производство биоаналогов создает экономическое давление на производителей оригинальных препаратов, стимулируя разработку инновационных препаратов, которые будут защищены действием патента. В таких условиях производители оригинальных препаратов стараются усовершенствовать уже зарегистрированные продукты, создавая новые, более удобные для использования лекарственные формы или новые дозировки.

1.6. Источники ТАП

ТАП был обнаружен во множестве тканей человека и животных. Впервые очищенный человеческий ТАП был получен из тканей матки (около 1 мг ТАП из 5 кг ткани) в 1979 году [75]. Очищенные препараты ТАП были также получены из свиного сердца и яичников, смыва с внутренней поверхности человеческих сосудов, крови человека [76]. Иммунологическими методами было доказано, что ТАП, полученный из тканей матки, ткани сосудов и ТАП, содержащийся в крови, идентичны друг другу. Так было установлено, что циркулирующий в крови ТАП секретируется, и главным секреторным органом является эндотелий сосудов [77]. Кажущийся наиболее логичным способ получения ТАП из плазмы крови оказался крайне неэффективным ввиду низкой концентрации циркулирующего ТАП (5-8 мкг/л); кроме того, большинство молекул ТАП в крови связано с ингибитором PAI-1 [78]. Эндотелиальные клетки сосудистой системы отличаются большой производительностью ТАП (до 9 мг/л культуральной жидкости) [79]. Продукция ТАП эндотелиальными клетками может быть повышена действием тромбина, адреналина, вазопрессина, брадикинина, но этот эффект носит кратковременный характер, а применение подобных стимуляторов неоправданно дорого [80, 81]. Для масштабного производства белка такие продуценты не подходят, так как помимо ТАП клетки эндотелия продуцируют в еще большем количестве его активные ингибиторы (PAI-1, PAI-2), что препятствует измерению активности белка и его очистке [82].

Синтез ТАП наблюдается во многих культурах клеток тканей человека, и достигает своего максимума в фазе роста клеточной культуры, сильно снижаясь при повышении плотности клеток. Онкогенная трансформация клеток во многих случаях приводит к повышению содержания активаторов плазминогена [83]. Значительные количества ТАП были получены из культуральной жидкости культуры клеток меланомы человека с продуктивностью около 60 мкг с 1 литра культуральной жидкости [84]. В эксперименте использовалась стабильная

клеточная линия меланомы (Bowes, RPMI-7272). Первоначально клетки были получены из метастатических клеток меланомы лёгких пациента по фамилии Bowes в 1974 году. Полученный ТАП оказался аналогичен ТАП, содержащемуся в нормальных человеческих тканях. Культура отличалась высокой производительностью по сравнению с клетками из любой ткани, и полученный продукт послужил основой для первых клинических исследований ТАП. Тем не менее, продукция ТАП культурой клеток меланомы была недостаточна для промышленного производства препарата. Были предприняты многочисленные попытки повысить продуктивность данной культуры. Адаптировать клетки меланомы к суспензионному культивированию с сохранением уровня экспрессии ТАП не удалось, но выращивание клеток меланомы в суспензии на микроносителях оказалось успешным [85]. Этот экспериментальный процесс показал возможность получения ТАП в длительных культивационных процессах с перфузией, но выход ТАП в количестве 2 мг/л не позволил получить экономически эффективную технологию даже при увеличении масштабов культивирования до 4000 л.

Получение ТАП из нормальных эпителиальных клеток хорошо изучено и охарактеризовано [86]. Первоначально исследователи заинтересовались получением ТАП из нормальных эпителиальных клеток как способом избежать опасностей использования раковой культуры при создании лекарственного препарата. Экспериментальной моделью послужили клеточные линии GPK (кератоциты уха морской свинки) и ВЕВ (клетки эпителия молочной железы человека). К сожалению, выход ТАП оказался в прямой зависимости от фазы роста культуры, а сама культура – от присутствия сыворотки в питательной среде, что значительно осложнило процесс очистки. Производимый эпителиальными клетками ТАП имел сниженную активность (12,5 тыс Ед/мг против 90 тыс Ед/мг) и сдвинутую изоэлектрическую точку (4,8 вместо 7,8) [87]. Опубликованная схема культивационного процесса предполагала использование микроносителей и режим коротких батчей (7 дней). Выход продукта составлял 5-10 мг с 1 литра среды, но

сниженная активность ТАП привела к тому, что выигрыша в терапевтических дозах по сравнению с культурой меланомы достичь не удалось [86, 88].

В качестве источника ТАП также исследовали человеческие фибробласты (линии клеток W 1-38 и IMR-90), которые были адаптированы для секреции большого количества ТАП с помощью стимуляции простагландинами, катехоламинами, ретиноидами. Этим способом удалось повысить выход белка приблизительно в 20 раз, однако, возвращение клеток в нормальные условия привело к прежней невысокой продуктивности (1.0 Ед на 10^6 клеток за день) [80].

Уже в начале 80-х годов стало ясно, что для производства терапевтического препарата необходимо использование более эффективных продуцентов, полученных на основе технологии рекомбинантной ДНК. Такой подход позволяет сделать производство экономически выгодным и в то же время избежать рисков, связанных с использованием человеческих опухолевых клеток. В 1983 году компания Genentech) запатентовала, помимо линии опухолевых клеток человека Bowes, трансфицированные геном ТАП линии клеток *E. coli* и СНО.

Клетки *E. coli*, содержащие ген ТАП, продуцировали фермент с низким выходом и недостаточной активностью, что было связано с неправильным фолдингом белка. Позднее была создана линия *E. coli*, снабженная дополнительными минорными генами тРНК для кодирования аргинина, что позволило повысить уровень экспрессии ТАП, хотя белок по-прежнему содержался в тельцах включения и требовал процедуры рефолдинга [89]. Кроме того, синтезированные в прокариотических системах человеческие белки не имеют необходимого гликозилирования. Многие исследователи рассматривают отсутствие гликозилирования как преимущество в отношении алтеплазы, поскольку негликозилированные формы ТАП медленнее метаболизируются в печени и имеют большее время жизни [54]. Только в 2015 году появились данные об экспрессии растворимого ТАП в цитоплазме *E. coli*, но продуктивность такого метода составила всего 0,9 мг/л культуральной жидкости [90], что потребовало бы биореакторов огромного объема для промышленного производства препарата. В

настоящее время *E. coli* активно используется для получения делетированных мутантов ТАП с удлинненным временем жизни, лишенных гликозилирования, в частности, ретеплазы. Продуктивность такого процесса составляет 12 мг/л [91].

Перспективными продуцентами ТАП являются трансгенные растения. Получение ТАП из растительного материала выгодно благодаря низким затратам на культивацию без необходимости использования высокотехнологичного оборудования. Сравнительно недавно стабильной продукции ТАП удалось добиться в растениях табака (до 7% от общего растворимого белка) [92] и огурца (до 1% от общего растворимого белка) [93].

Активный рекомбинантный ТАП был также получен из культур *Aspergillus nidulans* [94], мышинных клеток C127 [95], клеток бабочки *Spodoptera frugiperda*, инфицированных бакуловирусом [96], а также из молока трансгенных коз (3 мг/л) [97] и мышей [98].

1.7. Культивирование рТАП в клетках млекопитающих

Оптимальными системами для экспрессии генов человека и животных с получением активных рекомбинантных белков с корректными посттрансляционными модификациями являются клетки млекопитающих. После регистрации компанией Genentech первого рекомбинантного препарата ТАП в 1987 г., популярность клеточных линий млекопитающих для продукции биотехнологических препаратов нарастает. Например, из 58 биофармацевтических продуктов, зарегистрированных в 2006-2010 г., 32 производятся клетках млекопитающих [99, 100]. Среди всех доступных клеточных линий млекопитающих особо выделяется культура клеток яичников китайского хомячка (СНО), широко используемая в биофармацевтическом производстве. Ее основными преимуществами являются простота генноинженерных манипуляций, близкий человеческому паттерн гликозилирования, способность достигать высокой плотности клеточной популяции в бессывороточной суспензионной культуре.

Векторы для экспрессии ТАП в клетках СНО обычно содержат сильные промоторы для постоянной экспрессии и различные энхансерные последовательности, имеющие вирусное происхождение или заимствованные из регуляторных элементов генов иммуноглобулинов. Часто используются промоторы вирусов SV40, вируса папилломы коров (BPV), вируса Эпштейна-Барра (EBV), вируса саркомы RCV и аденовируса второго типа (Ad2). Амплификация копий гена ТАП внутри клетки во многих случаях достигается использованием метотрексата, цитостатического агента, необратимо ингибирующего дигидрофолат-редуктазу (ДФР), т.о. препятствующего синтезу пуриновых оснований. Некоторые клетки способны выживать при высокой концентрации метотрексата, амплифицируя структурный ген ДФР. Соответствующим образом сконструированный генетический вектор, в котором гены ТАП и ДФР расположены рядом, благодаря одновременной амплификации генов ДФР и ТАП под действием метотрексата, позволяет получить штаммы с постоянной высокой продуктивностью ТАП. Такая технология была впервые использована компанией Genentech для повышения выхода ТАП. В то же время действие метотрексата на клетки выражается также в увеличении времени удвоения и в повышении хрупкости клеточной мембраны, что может ограничивать круг моделей биореакторов, применимых для культивирования таких клеток [101].

Другим подходом к использованию клеток млекопитающих является создание гибридом из клеток СНО и клеток миеломы мышей. Такие гибридные культуры могут быть адаптированы к росту в бессывороточной среде в биореакторах с мешалкой и при выращивании в формате батча в течение 6 дней могут давать 100 мг ТАП на литр среды при плотности клеток 10^9 на мл [101].

Коммерческое производство ТАП компанией Дженетех было основано на применении метотрексатного метода амплификации гена ТАП в рекомбинантных клетках СНО; впоследствии клетки выращивались в свободном виде в суспензии в биореакторах объемом до 10 000 л [9]. В попытке уменьшить объем биореактора некоторые исследовательские группы выращивали культуру ТАП при повышенной

плотности клеток (более 10^8 клеток в 1 мл, тогда как обычная суспензионная культура обычно имеет плотность клеток несколько миллионов в 1 мл). В одной из таких технологий клетки прикреплялись к тяжелым микроносителям с коллагеновой матрицей. Микроносители поддерживались в суспензии током бессывороточной среды при перфузионном типе процесса. После стабилизации роста продукция составляла 65 мг/л и оставалась постоянной в течение 10 дней [101]. Другие протоколы культивирования клеток СНО в условиях высокой клеточной плотности также позволяли достичь высокой продуктивности; исследователи применяли перфузию на полых волокнах или камеры с керамическим матриксом для иммобилизации клеток. Однако такие методы культивирования так и не были использованы в промышленности, так как потребовали слишком много времени для достижения стационарного состояния, к тому же в таких процессах среда вокруг клетки становится гетерогенной, а охарактеризовать состояние биомассы не представляется возможным, вследствие чего контролировать процесс практически невозможно. Другой проблемой культивирования клеток СНО в условиях высокой клеточной плотности является необходимость постоянной перфузии больших объемов среды, а также постоянная нехватка кислорода внутри биореактора [101].

Более успешной альтернативой оказалось перфузионное культивирование с использованием самоочищающихся спинфилтров. Перфузия среды позволила повысить клеточную плотность в пять раз (до 10 млн/мл) по сравнению с периодическим культивированием. Объем перфузии составлял 400% в сутки, при этом продукция ТАП на объем среды была в 15-18 раз выше, чем в режиме периодического культивирования [102].

Для адгерантных линий СНО использование микроносителей является хорошим практическим решением для культивирования в режиме перфузии, так как облегчает удерживание клеток в биореакторе. Для полупериодического культивирования ТАП использовались микроносители из желатина и декстрана [103]. Другим перспективным вариантом использования микроносителей является

применение биореакторов типа airlift, в котором перемешивание микроносителей происходит под действием микропузырьков воздуха [101].

Помимо выбора линии клеток-продуцентов и проведения их успешной трансфекции, ключевыми факторами, влияющими на выходы целевого белка, являются селекция клона-продуцента и подбор условий культивирования. Важнейшим критерием отбора клонов является их продуктивность, однако при селекции также учитываются такие показатели, как время удвоения, стабильность роста и продуктивности, а также качество и гомогенность экспрессированного ими белка, в частности, гликозилирования [104]. Условия культивирования также могут оказывать значительное влияние на эти факторы, поэтому выбор используемого биореактора, тестирование различных питательных сред и подпиток, подбор режима культивирования зачастую играют решающую роль в повышении эффективности технологии получения белка. Современный процесс промышленной наработки ТАП может быть основан на суспензионном культивировании высокопродуктивных клеток СНО и будет являться эффективным и коммерчески оправданным при выходе целевого белка более 50 мг с литра культуральной жидкости.

1.8. Способы очистки ТАП

Использование рекомбинантных белков в фармакологических целях предполагает высочайшую степень их очистки, регламентируемую фармакопейными нормами. При этом, чистота продукта нормируется по содержанию чужеродных примесей (например, белков и ДНК клеток-продуцентов), родственных примесей (олигомерные формы, продукты деградации и т.д.), а также по функциональным свойствам. В случае ТАП, в конечной субстанции белок должен присутствовать преимущественно в виде мономера (не менее 95% от общего количества ТАП), преимущественно в одноцепочечной форме (не менее 60%) и иметь удельную специфическую активность, близкую к активности Международного стандарта ТАП (500 000 МЕ/мг) [105]. В связи с тем,

что в терапии ТАП используется в больших дозировках, особенно жесткие требования предъявляются к содержанию чужеродных примесей: содержание бактериальных эндотоксинов допускается не более 1 ЕД/мг, остаточных белков клеток-продуцентов – не более 20 нг/мг, остаточной ДНК клеток-продуцентов – не более 0,1 нг/мг ТАП. Для получения продукта, удовлетворяющего всем указанным требованиям, необходим комплексный подход с использованием различных методов очистки белка.

Помимо высоких требований чистоты для лекарственных препаратов процесс разработки способов очистки ТАП дополнительно осложнен некоторыми физико-химическими свойствами самого белка. Особенности, осложняющими очистку ТАП, являются склонность к образованию двуцепочечной формы, к формированию агрегатов и адгезии на стенках емкостей, малая растворимость при нейтральных значениях рН.

Применение того или иного метода очистки в значительной степени зависит от природы используемого исходного материала, в котором содержится целевой белок. Использование тканей и органов в качестве источника ТАП требовало множества стадий очистки и жестких условий, например, сильных хаотропных агентов (таких, как роданид калия KSCN) или растворов с низким рН. Низкое содержание ТАП в тканях позволяло получить лишь незначительные количества белка из нескольких килограммов исходного материала, что неоправданно дорого и технологически сложно [101]. В дальнейшем, с обнаружением культур клеток, секретирующих ТАП, и в особенности после разработки рекомбинантных методов получения ТАП, процесс очистки ТАП упростился, исследователи перешли к более эффективным иммуноаффинным колонкам и использовали даже одностадийные протоколы очистки [85]. Однако, исходя из современных регуляторных требований, для получения продукта надлежащего качества, как правило, требуется не менее трех стадий очистки.

Многие исследователи обращали внимание, что ТАП склонен к протеолитической деградации в процессе очистки, что приводит к образованию

двухцепочечной формы белка. Избежать этого можно путем добавления ингибиторов протеаз (в частности, апротинина) в культуральную среду и растворы, применяемые при очистке ТАП [106]. Однако, данный подход нежелателен при производстве препарата ТАП для медицинского применения, так как апротинин обладает гемостатическим действием, ингибируя плазмин [107], и способствует тромбообразованию, а значит, будет снижать эффективность действия ТАП.

Склонность ТАП к формированию агрегатов была выявлена уже при первых попытках очистки белка; тогда же было обнаружено, что ТАП адсорбируется на поверхности пластиковой и стеклянной лабораторной посуды, что приводит к значительному падению выхода продукта. Адсорбцию можно предотвратить, добавляя в используемые растворы неионогенные детергенты, в частности полисорбат-80 [75].

Первый высокоочищенный образец человеческого ТАП был получен в 1979 г. из ткани матки с использованием шестистадийной методики очистки, включавшей экстракцию ТАП из делипидированной ткани, осаждение сульфатом аммония и четыре хроматографические стадии очистки: металл-хелатную, гидрофобную, псевдоаффинную хроматографию и гель-фильтрацию. В качестве сорбента для металл-хелатной хроматографии использовалась цинк-хелатная агароза; ТАП элюировали в градиенте от 0 до 0,05 М имидазола в буфере, содержащем 1М NaCl. Для гидрофобной хроматографии использовалась колонка с *n*-бутил-агарозой; ТАП сорбировали на колонку в присутствии 3 М NaCl, и элюировали в обратном градиенте NaCl от 3 до 0 М. Псевдоаффинная стадия представляла собой хроматографию на ConA-агарозе. Конкавалин А, лиганд этого сорбента, является лектином, имеющим высокое сродство к остаткам α -D-маннозы и α -D-глюкозы, легко сорбирует богато гликозилированные молекулы ТАП. Десорбция ТАП с ConA-агарозы производилась градиентом от 0 до 0,6 М α -D-метилманнозида. Гель-фильтрацию проводили на Сефадексе G-150 в присутствии 1,6 М роданида калия (KSCN). Всего из 5 кг ткани матки было получено 1,2 мг ТАП с выходом активности 15% [75].

Сходный, хотя и более простой протокол очистки использовался при выделении ТАП из культуры клеток меланомы Bowes. Бессывороточную культуральную жидкость наносили на колонку с цинк-хелатной агарозой в буфере, содержащем 1 М NaCl, элюировали градиентом имидазола, как описано в работе [75]. Фракции, содержащие ТАП, объединяли и наносили на ConA-агарозу. ТАП элюировали с ConA-агарозы 0,2 М α -D-метилманнозидом в 1М KSCN. Затем проводили гель-фильтрацию сконцентрированного раствора на сорбенте Сефадекс G-150 в присутствии 1,5 М KSCN. Выход ТАП при проведении очистки по данному протоколу составил 46% [84]. Затем ту же процедуру очистки повторили с культуральной жидкостью и растворами, содержащими апротинин, что не сказалось на выходе и чистоте продукта [84]. В дальнейшем эта технология была масштабирована для выделения 2 г ТАП [108].

Позднее для того же исходного материала была разработана альтернативная схема очистки, включающая хроматографию на иммуноаффинном сорбенте в качестве первой стадии очистки, псевдоаффинную хроматографию на аргинин-сефарозе и гель-фильтрацию. Иммуноаффинный сорбент был приготовлен на основе сефарозы 4В, использовались козы антигена против свиного ТАП, высокомолекулярного человеческого. Элюция с колонки проводилась в 3 М KSCN. Элюат с иммуноаффинной колонки разбавляли в 10 раз 0,1 М натрий-фосфатным буфером и наносили на колонку с аргинин-сефарозой. Элюция проводилась в линейном градиенте гуанидин-хлорида от 0 до 1М. Затем проводили гель-фильтрацию объединенных и сконцентрированных фракций на Сефадексе G-150 в присутствии 1М бикарбоната аммония. Выход ТАП при очистке по данной методике составил 49%. Культивирование и очистка проводились в присутствии апротинина [109].

Похожая схема очистки была применена другими авторами для крупномасштабного выделения ТАП из 30 литров культуральной жидкости клеток меланомы Bowes. В качестве первой стадии использовалась иммуноаффинная колонка, аналогичная использованной в предыдущем методе. Затем следовала

псевдоаффинная очистка на лизин-сефарозе 4В и гель-фильтрация Сефадексе G-150. Выход ТАП составил 51% [110].

Высокая эффективность очистки ТАП на иммуноаффинных сорбентах вдохновила исследователей на создание упрощенных одностадийных методов очистки. Повышение емкости и избирательности сорбента в этом случае достигалось скринингом колоний мышинных гибридом, продуцирующих наиболее аффинное к ТАП моноклональное антитело. Такая одностадийная очистка позволяла при использовании КЖ меланомы Bowes получить препарат ТАП с выходом 79% [111].

Использовался также аффинный сорбент с иммобилизованным на агарозе ингибитором протеаз из бобов *Erythrina latissima*. Элюция с такого сорбента проводилась в 1,6 М KSCN. Такая одностадийная очистка позволяла при использовании КЖ меланомы Bowes получить препарат ТАП с выходом 96% [112].

В то же время для крупномасштабного получения ТАП из меланомы использовались методы, не включающие аффинные стадии. Так, в одном из описанных случаев бессывороточная культуральная жидкость (использовалась среда DMEM) наносилась непосредственно на катионообменный сорбент SP-сефарозу при pH 4,5. Элюцию ТАП проводили при том же pH в 0,1 М ацетатном буфере и градиенте NaCl от 0 до 1 М. Активные фракции объединяли, концентрировали и наносились на гель-фильтрационную колонку с сорбентом Сефадекс G-100. Выход при использовании такой методики составлял 61%, однако чистота препарата была низкой [106].

Для крупномасштабного получения ТАП использовался также метод, состоящий из двух стадий – хроматографии на цинк-хелатной сефарозе CL4В и лизин-сефарозе CL4В. Применение агарозы с кросс-сшивками позволило легко масштабировать процесс и ввести эффективные стадии санитизации и стерилизации. При хроматографии на цинк-хелатной сефарозе использовались промежуточные промывки с 1М NaCl и элюция 0,05 М имидазолом; при хроматографии на лизин-сефарозе применялась высокосолевая промывка (0,5 М

NaCl), целевой белок десорбировали с колонки в присутствии 0,5 М аргинина. Преимущество такой методики состояло в отсутствии стадий концентрирования, что существенно ускорило процесс [113].

Получение очищенного рекомбинантного ТАП из прокариотических клеток всегда было сопряжено со значительными трудностями. До недавнего времени не удавалось добиться прокариотической экспрессии ТАП в растворимом виде; синтезируемый клетками продукт содержался в тельцах включения и требовал экстракции и рефолдинга, который при таком большом количестве дисульфидных связей в белке часто дает низкий выход активного фермента.

Так, при культивации в *Bacillus subtilis* весь ТАП содержался в неактивной форме в тельцах включения, из которых был экстрагирован 6М гуанидином. Рефолдинг проводился в присутствии гуанидина, 2-меркаптоэтанола и глутатиона, его эффективность составила около 10%. Процедура очистки рефолдированного ТАП состояла из хроматографии на цинк-хелатной сефарозе и лизин-сефарозе. Таким образом, несмотря на достаточный уровень продуктивности (20 мг/кг биомассы), выход биологически активного ТАП оказался крайне низок (около 1 мг/кг биомассы) [114].

В цитоплазме *E. coli* ТАП также формирует нерастворимые и неактивные тельца включения. В первом отчете о получении активного фермента из *E. coli* включения ТАП растворяли в 7М гуанидин-хлориде в присутствии 50 мМ 2-меркаптоэтанола, затем ренатурировали в буфере, содержащем 2,5 М мочевины, 10 мМ лизин и глутатион. Такая процедура давала выход около 3 мг активного ТАП на 1 л культуры *E. coli* с оптической плотностью 1 ОЕ. Ренатурированный ТАП был очищен с использованием SP-трисакрила и лизин-сефарозы; выход очищенного белка по сравнению с ренатуратом составил 48% [115]. В других случаях для очистки ТАП из тел включения применялся препаративный ПААГ-электрофорез, аффинная хроматография на бензамидин-сефарозе [116], аффинный сорбент с иммобилизованным на агарозе ингибитором протеаз из бобов *Erythrina latissima*, цинк-хелатная сефароза [117]. Только в 2015 году была впервые описана

экспрессия ТАП в цитоплазме *E. coli* в растворимом виде. Экспрессированный конструкт содержал отрезаемый полигистидиновый тег, что облегчало очистку. Первой стадией очистки служила хроматография на сорбенте Ni-NTA, второй— ионообменная хроматография на DEAE-сефарозе. После ферментативного отрезания тега ТАП очищали гель-фильтрацией [90].

Клонирование гена ТАП в клетки млекопитающих было проведено одновременно с клонированием в *E. coli*. Наиболее перспективным объектом для получения ТАП в промышленных количествах оказались клетки СНО. Наиболее просто очищенный продукт удастся получить при культивировании СНО на бессывороточной среде. Основные приемы хроматографической очистки для такой культуральной жидкости те же, что и для других источников ТАП: это иммуноаффинная, псевдоаффинная, металлохелатная хроматография, катионообменная и гидрофобная хроматография, препаративная гель-фильтрация.

В 1990 году запатентован метод очистки ТАП с использованием колонки с иммобилизованными полианионами. В качестве колонки выступал карбоксилированный полиэтилен, иммобилизованный на силикагеле [118].

Описан метод высокоселективной хроматографии на катионообменном сорбенте карбоксиметил-сефарозе с промежуточной промывкой буфером с рН ниже, чем рК сорбента (таким образом элюируются примесные белки с рI равной или выше, чем у ТАП) [119]. Теми же авторами ранее запатентован метод очистки ТАП на катионообменном сорбенте при элюции градиентом NaCl [120].

В 1990 году был запатентован метод очистки ТАП с применением иммобилизованных на сорбенте аффинных трипептидов состава X-Y-Arg, где X и Y -- аминокислоты Pro, Phe, Trp и Tyr и пептидов состава Phe-Y-Arg, где Y аминокислота Phe, Pro, Trp, Tyr, Val, Ile или Glu [121]. В 2000 году запатентован еще один пептидный аффинный сорбент, в котором длина аффинных пептидов составляет 7-8 аминокислотных остатков [122].

Основываясь на сумме приведенных данных, можно утверждать, что наиболее эффективным способом очистки ТАП является использование аффинной хроматографии. Для изготовления аффинных к ТАП сорбентов использовались мышинные моноклональные антитела против человеческого ТАП [110] и козы поликлональные антитела против свиного ТАП [109]. Антитела ковалентно иммобилизовали на цианоген-бромид-активированную сефарозу. Полученный сорбент способен селективно связывать ТАП практически из любого исходного материала в широком диапазоне условий нанесения. Возможно также создание сорбентов на основе аффинных пептидов: были запатентованы последовательности трипептидов, аффинных к ТАП [121], а также методика скрининга и получения аффинных полипептидов с оптимизированными свойствами для использования в аффинной хроматографии ТАП [122].

Ключевым преимуществом аффинных сорбентов является их высочайшая специфичность к целевому белку, позволяющая за одну стадию уменьшить количество примесей в 100-1000 раз, в зависимости от чистоты исходного материала. Однако у таких сорбентов имеются серьезные недостатки, ограничивающие применение таких сорбентов в биотехнологии. Высокая стоимость и трудоемкость получения (особенно в случае моноклональных антител), низкая устойчивость (склонность к деградации белкового лиганда) при регенерации и санации сорбента после использования, возможность «утечки» белкового лиганда с сорбента в ходе элюции целевого белка, что требует введения дополнительной стадии очистки и контроля соответствующей примеси в готовой субстанции, являются ограничивающими факторами для использования аффинных сорбентов.

Хорошей альтернативой аффинной хроматографии является псевдо-аффинная хроматография. Взаимодействие псевдо-аффинных сорбентов с белком основано на его характерных свойствах, таких, как способность связывать определенные металлы или органические лиганды, наличие олигосахаридных ветвей и т.п. Чаще всего для очистки ТАП используются цинк-хелатная

хроматография [84, 108, 113], а также сорбенты с иммобилизованным лизином [110, 113] или аргинином [109, 110], имитирующие ТАП-связывающий участок молекулы фибрина, содержащий большое количество этих аминокислот. Также описаны методики очистки, в которых используются иммобилизованные на носителе конкавалин А, [84, 108] и различные ингибиторы сериновых протеаз [116]. Поскольку селективность псевдо-аффинных сорбентов к целевому белку недостаточна для одностадийного получения продукта высокой чистоты, в процессе очистки ТАП часто применяется комбинация из двух или более псевдо-аффинных хроматографических стадий. Преимуществом псевдо-аффинных сорбентов перед аффинными является их коммерческая доступность и высокая химическая устойчивость, что упрощает технологический процесс и снижает себестоимость продукта.

В качестве дополнительных стадий очистки ТАП обычно применяют катионообменную хроматографию на сорбентах, имеющих отрицательный заряд за счет лигандов с карбоксильной, карбоксиметильной или сульфо-группой. Также широко применяется гель-фильтрационная хроматография на различных носителях, позволяющая разделять белки по их молекулярному весу и одновременно переводить целевой белок в требуемый буферный раствор для хранения и дальнейшего использования [75, 84, 90, 106, 108-110]. В отдельных случаях в методиках выделения ТАП используется гидрофобная хроматография [109].

Помимо хроматографических методов применяется осаждение ТАП сульфатом аммония [75], позволяющее, помимо дополнительной очистки от примесей, сконцентрировать белок перед последующей стадией.

1.9. Получение тенектеплазы

В 1993 году группа исследователей методом точечного мутагенеза разработала более активную и селективную форму ТАП, заменив аминокислотные остатки 296-299 на тетрааланиновую последовательность AAAA [123]. В

следующем году та же группа исследователей добавила к конструктору также замены T103N и N117Q, способствующие увеличению времени жизни молекулы в кровотоке [124]. Новый тромболитический препарат получил название TNK-tPA или тенектеплаза. Исследователи использовали для трансфекции человеческую клеточную линию HEK293, экспрессию проводили в бессывороточной культуральной среде и анализировали полученные варианты рТАП без дополнительной очистки [125].

С 2000 по 2014 годы тенектеплаза производилась компанией Genentech, с 2001 года – также компаниям Boehringer Ingelheim и Hoffmann La Roche. В настоящее время тенектеплаза производится по технологии рекомбинантной ДНК в клетках CHO [2]. Более подробная информация о способах культивирования и очистки, применяемых производителями, не публиковалась.

Способы очистки тенектеплазы, запатентованные компанией Genova Biopharmaceuticals Limited, включают стадии аффинной хроматографии на сорбенте Blue Sepahrose FF (GE), вирусной инактивации и фильтрации, катион-обменной хроматографии, причем количество стадий аффинной хроматографии в одном протоколе очистки может достигать до трех [126].

В способе очистки, запатентованном компанией Avesthagen Limited [127], в качестве первой стадии очистки выступает катион-обменная хроматография. Тенектеплаза из осветленной культуральной жидкости сорбируется на колонку при pH 5,0 и элюируется в присутствии 300 mM аргинина и 1M NaCl. Элюат диафильтруют против буфера, содержащего 50 mM Трис pH 8,0, и проводят анион-обменную хроматографию. Тенектеплазу элюируют с анион-обменного сорбента при pH 4,0, затем проводят вирусную фильтрацию и приготовление субстанции ГЛФ.

1.10. Вирусная безопасность

Для биотехнологических препаратов, полученных с использованием клеток животного происхождения, одним из важных аспектов безопасности при медицинском применении предотвращение и контроль возможной вирусной контаминации. В большинстве стран установлены специальные требования как к сырью для производства препаратов, так и к методам тестирования и удаления вирусов из лекарственных препаратов. Особенно большой риск вирусной контаминации присутствует при производстве биологических препаратов, в котором предполагается использование материала животного или человеческого происхождения. Источники вирусной контаминации можно разделить на две группы в зависимости от их происхождения. Для первой группы эндогенных вирусов источником служит исходный материал, например, банки клеток, кровь, ткани человека или животных; во втором случае контаминанты могут быть привнесены в субстанцию в процессе производства, например, из сыворотки животных, добавляемой в культуральную среду, или от сотрудников предприятия, контактирующих с препаратом.

В прошлом ряд биологических препаратов, производимых из плазмы крови человека, а также некоторые вакцины, были контаминированы вирусами. В некоторых случаях вирус обнаруживался лишь спустя долгое время после вывода препарата на рынок. Так, время второй мировой войны у нескольких тысяч солдат армии США возник гепатит В после вакцинации против желтой лихорадки; эту вспышку связывают с использованием сыворотки человека для стабилизации вакцины [128]. Вакцины против полиомиелита и аденовирусной инфекции, производимые в 1950-1960 годах на первичных культурах клеток почки макаки-резуса, были заражены онкогенным вирусом SV40 [129]. Для препаратов, получаемых из плазмы крови человека, высок риск контаминации вирусами ВИЧ и гепатита В и С [130]. Несмотря на то, что для препаратов, производимых по технологии рекомбинантной ДНК, случаев выпуска в оборот контаминированных препаратов не зафиксировано, вирусная контаминация на любом из этапов производства может нести серьезные последствия, и приводить к задержкам

производства, репутационным и финансовым рискам. Например, обнаружение в 2009 году в ходе производства Церезима компанией Genzyme калицивируса в конечном итоге привело к банкротству компании [131].

Любой процесс производства, основанный на использовании клеточных линий млекопитающих, может привести к вирусному загрязнению конечного продукта. Широко используемые при производстве рекомбинантных белков клетки СНО по своей природе неизбежно содержат эндогенные ретровирусподобные частицы [132]. Обычно эти частицы не являются инфекционными, но, тем не менее, их присутствие в конечном продукте крайне нежелательно.

Для контроля вирусной контаминации необходимо использовать комбинацию из трех взаимодополняющих подходов [133], [134]:

- Анализ исходных материалов на присутствие вирусных загрязнителей
- Испытание производственных процессов на способность удалять вирусы
- Анализ препарата на различных этапах производства на предмет отсутствия вирусов.

Ни один из этих подходов сам по себе не дает достаточной гарантии вирусной безопасности.

Знания о потенциальных источниках контаминации позволяют разрабатывать и внедрять стратегии борьбы с ними, поэтому первым шагом к обеспечению вирусной безопасности является характеристика мастер-банка и рабочего банка клона-продуцента. При разработке противовирусных стадий исследователи должны найти баланс между стремлением к достижению вирусной безопасности и сохранением структуры и биологической активности продукта [135].

Количество вирусов в ходе производства продукта может быть снижено двумя путями: удаление вирусных частиц или инактивацией вирусов. Большинство методов инактивации эффективны против оболочечных вирусов, для

безоболочечных вирусов их эффективность ограничена. Инактивация вирусов включает в себя химические (использование органических растворителей, пониженного pH, детергентов) и физические (высушивание и пастеризация) методы. Удаление вирусных частиц осуществляется методами преципитации, хроматографии или мембранной фильтрации.

Стадии вирусной очистки необходимо валидировать в соответствии с соответствующим руководством. Общая схема инактивации/элиминации должна быть направлена на широкий диапазон оболочечных и безоболочечных вирусов, включая пока неизвестные [136]. Процесс валидации эффективности противовирусных стадий включает в себя демасштабирование процесса очистки, внесение в неочищенный препарат вирусного концентрата, определение коэффициента очистки от вируса для валидируемой стадии и суммирование коэффициентов очистки всех валидируемых стадий с получением суммарного коэффициента снижения содержания вирусов для всего процесса.

Для проведения валидации стадий вирусной очистки в процессе производства препаратов используют модельные вирусы. Они должны быть теми же, что обнаружены как контаминанты клеточной линии, или сходны с потенциальными вирусами-контаминантами, обладать широким диапазоном физико-химических свойств и доступны для выявления быстрыми методами лабораторного определения. Рекомендуется включение в процесс очистки не менее двух направленных ортогональных противовирусных стадий с хорошо описанным механизмом удаления/инактивации. Одна из стадий технологического процесса должна гарантировать эффективное удаление безоболочечных вирусов. Панель тестовых вирусов должна содержать не менее трех ДНК- и РНК-содержащих оболочечных и безоболочечных вирусов [137].

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

Разработка технологии промышленного производства рекомбинантного человеческого тканевого активатора плазминогена была проведена в Международном Биотехнологическом Центре «ГЕНЕРИУМ».

2.1.1. Схема исследования

Диссертационная работа состоит из двух частей, посвященных разработке технологии получения алтеплазы и тенектеплазы соответственно. Обе части имеют схожий план исследования, схематически представленный на рисунке 2.

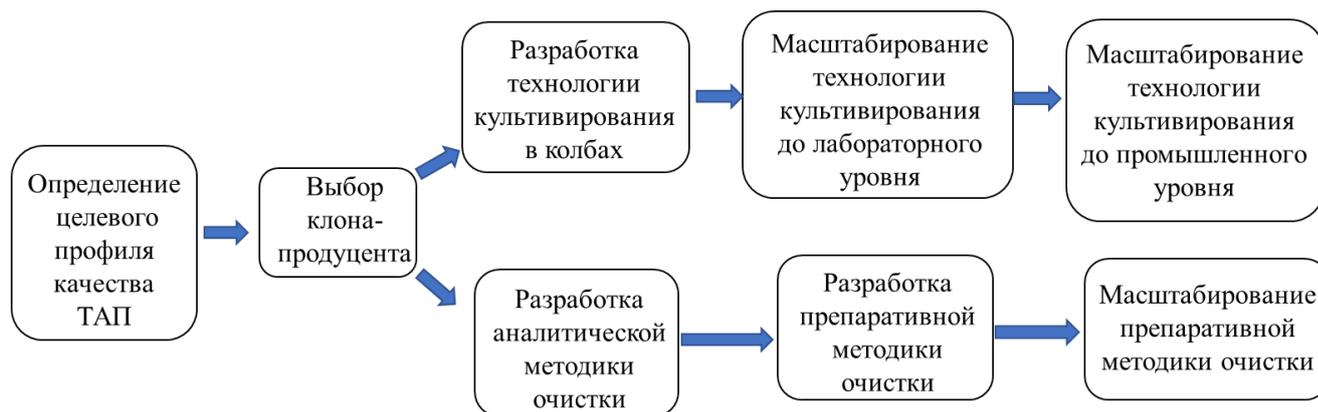


Рисунок 2. Схема плана исследования.

2.1.2. Клеточная культура

Клон-продуцент, полученный на базе клеточной линии CHO-DG44 (ThermoFisher, США), содержащий плазмиду pBK415 (EUROSCARF, Германия), несущую полноразмерный ген человеческого ТАП, для биосинтеза алтеплазы. Клон-продуцент, полученный на базе клеточной линии CHO-M (Selexis, США), содержащий плазмиду pSURE191 (Selexis, США), несущую мутантный ген тенектеплазы, для биосинтеза препарата тенектеплазы. Последовательности генов ТАП взяты из базы KEGG (Япония), подтверждены методом масс-

спектрометрического анализа референтных препаратов и синтезированы в компании TopGene Technologies (Канада).

2.1.3. Среда и добавки, использованные при культивировании

В процессе культивирования продуцента использовались питательные среда BalanCD CHO Growth A (Irvine Scientific, США) и SFM4CHO (HyClone, США) с подпитками производства Irvine Scientific (США) и HyClone(США). Также в культуральные среды добавляли L-Глутамин (Applichem, Германия). Для пеногашения использовали Плуороник F68 (Applichem, Германия) и Полоксамер 188 (HyClone, США). В питательную среду добавляли натрия бикарбонат (Applichem, Германия) и ДМСО (Sigma, США).

2.1.4. Реактивы и материалы, использованные при очистке ТАП

Очистку препаратов алтеплазы и тенектеплазы проводили хроматографическими методами с использованием металлохелатной, ионообменной, аффинной, гидрофобной, мультимодальной хроматографии на сорбентах с агарозной и метакрилатной матрицей производства Cytiva (США), Tosoh (Япония), Thermo Fisher Scientific (США), YMC (Япония) на хроматографических системах АКТА Pure, АКТА Pilot и АКТА Process производства Cytiva (США).

Вирусную фильтрацию проводили на фильтрах Planova (Asahi Kasei, Япония).

При приготовления растворов для очистки рТАП использовали 95 % раствор этилового спирта (490914, ЗАО «ЭКОлаб», Россия), натрия хлорид (141659.0416, Panreac, США), твин 80 (142050.1611, Panreac, США), натрия гидроксид (A3910.1000, Panreac, США), изопропиловый спирт (141545.1211, Panreac, США), трис-основание (T6066, SIGMA, США), имидазол (56750, SIGMA, США), натрия ацетат (141632.1211, Panreac, США), кислоту уксусную ледяную (141008, Panreac, США), натрия гидроксид (A3910.1000, Panreac, США), изопропиловый спирт (141545.1211, Panreac, США), трис-основание (T6066, SIGMA, США), имидазол

(56750, SIGMA, США), натрия ацетат (141632.1211, Panreac, США), кислоту уксусную ледяную (141008, Panreac, США), мочевины (A6832,9025, AppliChem, США), L-аргинин (A4474, SIGMA, США), L-аргинин-гидрохлорид (A6969, SIGMA, США), ЭДТА (131026.1211, Panreac, США), этиленгликоль (A3682, AppliChem, США), сахарозу (S7903, SIGMA, США), калия тиоционат (207799, SIGMA, США), бикарбонат натрия (S5761, SIGMA, США), гидрокарбонат натрия (S7795, SIGMA, США), L-лизин-хлорид (144764.1211, Panreac, США), натрия фосфат однозамещенный (S9638, SIGMA, США), натрия фосфат двузамещенный (S9763, SIGMA, США), цинка хлорид (96468, SIGMA, США), кислоту соляную (141020.1612, Panreac, США), каприлат натрия (196454.0914, Panreac, США).

2.1.5. Расконсервация культуры клеток

Разморозку ампул криобанка проводили на водяной бане при температуре 37 °С. Содержимое ампулы переносили в стерильную пробирку объемом 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, осадок клеток ресуспендировали в 25 мл свежей питательной среды и переносили в колбу Эрленмейера объемом 125 мл.

2.1.6. Культивирование клеток в колбах Эрленмейера

Расконсервированные клетки, помещенные в ростовую среду, выращивали в шейкере-инкубаторе Climo-Shaker ISF1-XC (Kuhner, Германия) в колбах Эрленмейера объемом 125 мл. Культивировали при условиях: температура культивирования $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$, концентрация CO_2 в газовой фазе $5,0 \pm 2,0 \%$, частота качаний 30 ± 5 качаний/мин. Клетки культивировали в течение 2–5 сут. до достижения концентрации от 2,0 до 6,0 млн. кл./мл в суспензии. При достижении концентрации клеток в указанном диапазоне клетки использовали в качестве инокулята.

Аналогичные условия культивирования в колбах Эрленмейера использовали в ходе первичных экспериментов по подбору состава питательных сред.

2.1.7. Культивирование клона-продуцента алтеплазы в механическом биореакторе в режиме перфузии

Полученную в колбе Эрленмейера суспензию клеток переносили по (10 ± 2) мл в 2 культуральных флакона (с площадью рабочей поверхности 175 см^2). Далее добавляли в каждый флакон питательную среду SFM4CHO по (40 ± 5) мл и перемешивали. Культуральные флаконы с клетками помещали на рокер-шейкеры, установленные в CO_2 -инкубатор. Клетки культивали при условиях: частота качаний флаконов (30 ± 10) качаний/мин, температура культивирования $(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$, концентрация CO_2 в газовой фазе $(5,0 \pm 2,0) \%$, угол наклона от 8 до 10° до получения концентрации клеток от $1,0$ до $1,0$ млн. кл./мл в течение $(2-5)$ сут. Полученную суспензию клеток из 2 культуральных флаконов объединяли в 1 роллерную бутылку с площадью рабочей поверхности 4250 см^2 . Затем добавляли в роллерную бутылку питательную среду SFM4CHO (400 ± 100) мл.

Роллерную бутылку с культурой клеток помещали в роллерную деку, установленную в CO_2 -инкубатор. Клетки культивировали при условиях: температура культивирования плюс $(37,0 \pm 1,0) \text{ }^\circ\text{C}$, концентрация CO_2 в газовой фазе $(5,0 \pm 2,0) \%$, скорость вращения роллеров (40 ± 5) об/мин. в течение $2 - 5$ сут до получения концентрации $2,0$ до $6,0$ млн. кл./мл в суспензии. Полученную суспензию клеток из 1 роллерной бутылки пересевали в 10 роллерных бутылей (с площадью рабочей поверхности 4250 см^2). В каждую роллерную бутылку вносили суспензию клеток по (50 ± 10) мл и добавляли питательную среду SFM4CHO по (450 ± 45) мл. Роллерные бутылки с культурой клеток помещали в роллерную деку, установленную в CO_2 -инкубатор. Клетки культивировали при условиях: температура культивирования плюс $(37,0 \pm 1,0) \text{ }^\circ\text{C}$, концентрация CO_2 в газовой фазе $(5,0 \pm 2,0) \%$, скорость вращения роллеров (40 ± 10) об/мин до получения концентрации клеток от $1,0$ до $5,0$ млн.кл./мл в суспензии в течение $(2 - 5)$ сут. Полученную суспензию клеток использовали для засева биореактора объемом 100 л.

Для получения продукционной КЖ устанавливали стерильный мешок для культивирования клеток в биореактор, устанавливали нагреватель выходного фильтра. Мешок надували стерильным сжатым воздухом до упругого состояния. К мешку в биореакторе стерильно подключали мешок с питательной средой SFM4CHO. Биореактор тарировали и заполняли питательной средой SFM4CHO в количестве $(35,0 \pm 15,0)$ кг. Устанавливали температуру $37,0 \pm 0,5$ С, скорость перемешивания 130 ± 40 об/мин, значения параметров культивирования клеток рН $7,0 \pm 0,6$ и DO от 15,0 до 35,0 %. Перекачивали суспензию клеток, полученную в роллерах, в биореактор SUB 100L (HyClone). Через 2 сут. после засева биореактора доводили массу суспензии клеток до $(80,0 \pm 25,0)$ кг питательной средой SFM4CHO.

При достижении концентрации клеток от 3,0 до 6,0 млн.кл./мл начинали процесс перфузии (сбор культуральной жидкости). Устанавливали на системе тангенциальной перфузии ATF6 (Repligen, США) объемный расход в 100 – 250 раз выше, чем скорость фильтрации $(1,5 \pm 1)$ л/ч. Проводили перфузию, используя два перистальтических насоса: один – для подачи питательной среды, второй – для отбора перфузата.

Через сутки устанавливали температуру культивирования клеток плюс $(32,0 \pm 0,5)$ °С.

Ежесуточно (каждые 24 ± 3 ч) собирали перфузат в стерильный мешок, который заменяли новым. Процесс получения перфузатов завершали при снижении доли жизнеспособных клеток менее 50,0 % и/или концентрации белка в перфузате менее 40 мг/л. Перфузат не содержал клеток и клеточного дебриса и передавался для проведения хроматографической очистки без дополнительного осветления.

2.1.8. Культивирование клон-продуцента тенектеплазы в механическом биореакторе в периодическом режиме

Полученную в колбе Эрленмейера объемом 125 мл суспензию клеток переносили в культуральную колбу Эрленмейера объемом 1000 мл для получения

посевной концентрации $0,3 \pm 0,03$ млн./мл, добавляли питательную среду BalanCD CHO Growth A до 240 ± 10 мл и перемешивали. Культуральные колбы с суспензией клеток помещали на орбитальный шейкер Celltron (Infors HT, Германия), установленный в CO₂-инкубаторе MCO-20AIC (Sanyo, Япония). Клетки культивировали при условиях: температура культивирования $37,0 \pm 1,0$ °С, концентрация CO₂ в газовой фазе (5 ± 2) %, скорость движения платформы (80–100) об/мин. Клетки культивировали в течение 3 суток до концентрации от 3,0 до 6,0 млн./мл. Полученную суспензию клеток использовали для следующего этапа получения посевного материала в волновом биореакторе.

Устанавливали стерильный мешок для культивирования в волновой биореактор WAVE 25 (Cytiva, США), устанавливали нагреватель выходного фильтра. В мешок нагнетали стерильный воздух до упругого состояния. В тарированный биореактор перекачивали BalanCD CHO Growth A в количестве ($4,8 \pm 0,2$) кг. Устанавливали температуру ($37,0 \pm 1,0$) °С, угол качания платформы (5–10) °, частоту качания платформы (20–40) кач./мин и концентрацию CO₂ (5 ± 1) %. В мешок биореактора помещали 240 ± 10 мл суспензии клеток, полученных на предыдущем этапе культивирования. Клетки культивировали при условиях: температура культивирования $37,0 \pm 1,0$ °С, концентрация CO₂ в газовой фазе 5 ± 2 %, угол качания платформы 5–10°, частота качания платформы 25–35 кач./мин. в течение 3 суток до достижения концентрации от 4,0 до 8,0 млн./мл.

Устанавливали контейнер одноразовый для культивирования в биореактор SUB 100L (HyClone, США). Устанавливали стерильный датчик растворенного кислорода, на выходной фильтр устанавливали нагреватель. Мешок для культивирования наполняли стерильным сжатым воздухом до упругого состояния. Биореактор тарировали и заполняли питательной средой в количестве 45,0 - 95,0 кг. Питательную среду нагревали до рабочей температуры $37,0 \pm 1,0$ °С и уравнивали с газовой фазой, затем калибровали датчик растворенного кислорода на 95 %. Затем производили засев биореактора посевным материалом клеток. Устанавливали параметры культивирования клеток:

- температура культивирования с 0 до 120 часов ($37,0 \pm 0,5$) °C, через 120 часов температуру плавно снижали до ($32,0 \pm 0,5$) °C в течение 3 часов;
- обороты мешалки (60–80) об/мин;
- концентрация растворённого кислорода (20–40) %; поддерживалась автоматически подачей воздуха через микробарботер.
- pH $7.0 \pm 0,05$, поддерживался автоматически подачей CO₂ через газовоздушную линию микробарботера и подачей 5 % раствора натрия гидроксида.

С 72 до 216 часов в реактор непрерывно подавали питательную добавку BalanCD CHO Feed 2 со скоростью 3% от начального объема среды в сутки.

Раствор пеногасителя непрерывно подавали со скоростью 0,5–1,0 мл/кг/сут. При возможном появлении пены допускалась болюсная подача по 25–50 мл пеногасителя до ее исчезновения.

Штатная продолжительность процесса культивирования составляла 8 суток. Процесс завершали досрочно при снижении доли жизнеспособных клеток ниже 85%.

2.1.9. Глубинная фильтрация

Осветление культуральной жидкости от клеток и клеточного дебриса проводили на глубинных фильтрах ZetaPlus (3M, США). Подачу культуральной жидкости осуществляли с помощью перистальтического насоса L/S Standard Digital Pump (MasterFlex, Германия) со скоростью 0,1–0,5 мл/см²/мин.

2.1.10. Очистка алтеплазы, получение фармацевтической субстанции

Цинк-хелатную хроматографию проводили на металлохелатном сорбенте с метакрилатной матрицей EMD Chelate Fractogel (Millipore, США). Колонну заряжали ионами цинка и уравнивали в стартовом буфере состава 20 мМ Трис-НСl, 0.1 М NaCl, pH 8.0. На заряженную и уравновешенную колонну наносили культуральную жидкость, затем промывали стартовым буфером и буферными растворами на основе 20 мМ Трис-НСl, содержащими хлорид натрия в

концентрации 1,5–4 М; изопропанол в концентрации 10–25 %; каприлат натрия в концентрации 0,03–0,15 М; мочевины в концентрации 0,5–2 М. Объемы промывок составляли не менее 5 объемов колонны. Элюцию проводили линейным градиентом буферного раствора, содержащего мочевины в концентрации 0,5–2 М, NaCl в концентрации 1–1,5 М и имеющим значение pH 3,5–5,0. Сорбент регенерировали и санитизировали, последовательно промывая растворами, содержащими 0,5 М ЭДТА, 0,5 М NaOH, 20% этанол.

Аффинную хроматографию проводили на пептидном аффинном сорбенте Capture Select tPA (Thermo Fisher Scientific, США). Колонну уравнивали в стартовом буфере состава 100 мМ ацетат натрия, pH 5,5. На уравновешенную в стартовом буфере колонну наносили раствор целевого белка. После нанесения раствора белка колонну последовательно промывали стартовым буфером и растворами на основе 20 мМ Трис-HCl, содержащими хлорид натрия в концентрации 1,5–3,0 М; каприлат натрия в концентрации 0,1–0,3 М, мочевины в концентрации 0,5–1,5 М; аргинин в концентрации 0,1–0,15 М. Объемы промывок составляли не менее 5 объемов колонны. Элюцию целевого белка проводили буферным раствором, содержащим аргинин в концентрации 400 мМ имеющим pH 4,0–4,5. Сорбент регенерировали и санитизировали, последовательно промывая растворами, содержащими 50 мМ цитрат натрия pH 2,8 и 20% этанол.

Вирусную инактивацию проводили в растворе белка, полученном при элюции со стадии аффинной хроматографии. pH раствора приводили к 3,5 добавлением 0,5 М уксусной кислоты, и выдерживали при комнатной температуре при перемешивании в течение 1 часа. Затем pH раствора приводили к 5,0 добавлением 0,5 М NaOH.

Перевод алтеплазы в раствор ГЛФ проводили путем хроматографии на сильном катионообменном сорбенте Eshmuno S (Millipore, США). Колонну уравнивали стартовым буфером состава 50 мМ ацетат натрия, pH 5. На уравновешенную колонну наносили раствор алтеплазы. После нанесения образца колонну промывали стартовым буфером, затем раствором состава 50 мМ аргинин,

pH 6,0. Целевой белок элюировали с колонны раствором состава 450 аргинин, pH 7,3. В элюате приводили содержание аргинин-фосфата к 400 мМ путем разбавления водой, и значения pH до $7,3 \pm 0,05$ ед путем титрования раствором гидроксида натрия или фосфорной кислоты. Сорбент регенерировали и санитизировали, последовательно промывая растворами, содержащими 2 М NaCl, 0,5 М NaOH, 20% этанол.

Анионообменную фильтрацию проводили на сильном анионообменном сорбенте. Колонну уравнивали в стартовом буфере состава 400 мМ Аргинин-фосфат, pH 7,3. Образец алтеплазы в буфере ГЛФ фильтровали через уравниваемую в стартовом буфере колонну, фильтрат собирали. Сорбент регенерировали и санитизировали, последовательно промывая растворами, содержащими 2 М NaCl, 0,5 М NaOH, 20% этанол.

Противовирусную фильтрацию проводили на фильтре Planova 20N (Asahi, Япония) с предфильтром Millex (Millipor, США). Подсоединяли манометр и шланговую магистраль к предфильтру, затем к противовирусному фильтру. Устанавливали скорость потока на перистальтическом дозаторе L/S Standard Digital Pump (MasterFlex, Германия) таким образом, чтобы входное давление на противовирусном фильтре находилось в диапазоне от 1,0 до 3,0 бар в течение проведения противовирусной фильтрации раствора белка. Смачивали фильтр ВДИ, затем промывали 0,5 М раствора натрия гидроксида в замкнутом цикле, выдерживая время контакта системы не менее 1,0 ч. Далее промывали ВДИ и уравнивают в буфере ГЛФ. Затем буфер ГЛФ сливали из системы. Разбавляли раствор алтеплазы буфером ГЛФ до конечной концентрации белка 2 мг/мл. К разбавленному раствору алтеплазы добавляли 20% раствор Твин 80 до конечной концентрации Твин 80 0,2%. Проводили фильтрацию полученного раствора алтеплазы через предфильтр и противовирусный фильтр, контролируя входное давление на фильтре.

2.1.11. Очистка тенектеплазы, получение фармацевтической субстанции

В качестве стадии захвата использовали гидрофобную хроматографию на сорбенте с фенильной функциональной группой. Колонну уравнивали в стартовом буфере состава 50 мМ Трис, 0,5 М NaCl, 2 М мочевины, pH 7,3. На уравновешенную в стартовом буфере колонну наносили культуральную жидкость, содержащую тенектеплазу. После нанесения образца колонну промывали стартовым буфером, объем промывки составлял не менее 5 колоночных объемов. Элюцию целевого белка проводили линейным градиентом буфера состава 50 мМ трис, 30% спирт изопропиловый, 2 М мочевины, pH 7,3. Сорбент регенерировали и санитизировали, последовательно промывая растворами, содержащими 0,5 М NaOH, 30% изопропанол, 20% этанол.

Аффинную хроматографию проводили на сорбенте, где в качестве функциональной группы присутствует иммобилизованный лизин. Колонну уравнивали в стартовом буфере состава 20 мМ Трис, 100 мМ NaCl, pH 7,5. На уравновешенную в стартовом буфере колонну наносили образец, содержащий тенектеплазу. После нанесения образца колонну отмывали стартовым буфером и растворами на основе 20 мМ трис-HCl, содержащими 1М NaCl; 2М мочевины. Объемы промывок составляли не менее 5 объемов колонны. Тенектеплазу элюировали раствором состава 20 мМ Трис, 50 мМ лизин гидрохлорид, 2М мочевины, pH 8,0. Сорбент регенерировали и санитизировали, последовательно промывая растворами, содержащими 0,5 М NaOH, 20% этанол.

Анионообменную фильтрацию проводили на сильном анионообменном сорбенте Q-Sepharose (Cytiva, США). Колонну уравнивали в стартовом буфере состава 20 мМ Трис, 100 мМ NaCl, pH 9. Образец тенектеплазы фильтровали через уравновешенную в стартовом буфере колонну, фильтрат собирали. Сорбент регенерировали и санитизировали, последовательно промывая растворами, содержащими 2 М NaCl, 0,5 М NaOH, 20% этанол.

Мультимодальную хроматографию проводили на слабом катионообменном сорбенте с дополнительной гидрофобной функциональной группой. Колонну уравнивали в стартовом буфере состава 20 мМ трис, 2 М мочевины, рН 9,0. На уравновешенную в стартовом буфере колонну наносили раствор тенектеплазы. После нанесения образца колонну отмывали стартовым буфером и раствором на основе 20 мМ Трис, рН 9,0, содержащим 5% спирт изопропиловый. Целевой белок элюировали линейным градиентом раствора, содержащего 1 М NH_4Cl и 20% спирт изопропиловый. Сорбент регенерировали и санитизировали, последовательно промывая растворами, содержащими 0,5 М NaOH , 30% спирт изопропиловый, 20% этанол.

Перевод тенектеплазы в буфер ГЛФ проводили путем хроматографии на соль-толерантном анионообменном сорбенте. Колонну уравнивали в стартовом буфере состава 20 мМ Трис, 2 М мочевины, рН 9,0. На уравновешенную в стартовом буфере колонну наносили раствор тенектеплазы. После нанесения образца колонну отмывали стартовым буфером и раствором на основе 20 мМ Трис, рН 9,0, содержащим 10 мМ Аргинин-фосфат. Целевой белок элюировали линейным градиентом раствора, содержащего аргинин-фосфат. Сорбент регенерировали и санитизировали, последовательно промывая растворами, содержащими 2М NaCl , 0,5 М NaOH , 20% этанол. К полученному элюату добавляли раствор 1,2 М аргинин-фосфат до конечной концентрации аргинина 400 мМ. Концентрацию белка приводили к 5 мг/мл добавлением раствора 400 мМ Аргинин-фосфата.

Противовирусную фильтрацию проводили на фильтре Planova 20N (Asahi, Япония) с предфильтром Millex (Millipor, США). Подсоединяли манометр и шланговую магистраль к предфильтру, затем к противовирусному фильтру. Устанавливали скорость потока на перистальтическом дозаторе L/S Standard Digital Pump (MasterFlex, Германия), таким образом, чтобы входное давление на противовирусном фильтре находилось в диапазоне от 1,0 до 3,0 бар в течение проведения противовирусной фильтрации раствора белка. Смачивали фильтр ВДИ, затем промывали 0,5 М раствора натрия гидроксида в замкнутом цикле,

выдерживая время контакта системы не менее 1,0 ч. Далее промывали ВДИ и уравнивают в буфере ГЛФ. Затем буфер ГЛФ сливали из системы. К раствору тенектеплазы добавляли раствор 20% Твин 20 до конечной концентрации Твин 20 0,04%. Проводили фильтрацию полученного раствора тенектеплазы через предфильтр и противовирусный фильтр, контролируя входное давление на фильтре.

2.1.12. Определение содержания мономера ТАП методом геле- фильтрационной ВЭЖХ

Для проведения ГФ-ВЭЖХ использовали хроматограф Alliance 2695 (Agilent, США), с детектором UV/Visible Detector 2489 (Agilent, США), колонку TSK gel G3000SW 7,5x600 мм (Tosoh, Япония), предколонку Phenomenex Security Guard Cartridge, GFC 3000, 4x3,0 мм (Phenomenex, США). Скорость потока составляла 0.5 мл/мин, время регистрации хроматограммы – 60 мин, объём инъекции – 50 мкл (исследуемый образец наносился на колонку без пробоподготовки), длина волны детектора 214 нм. Использовали подвижную фазу следующего состава: 0,265 М NaH_2PO_4 ; 0.1% SDS; pH 6.8. Перед началом анализа хроматографическую колонку уравнивали подвижной фазой до формирования стабильной базовой линии. Хроматографировали растворы в следующей последовательности: раствор плацебо, стандартный образец ТАП, исследуемый раствор ТАП. Время удержания пика мономера ТАП при данных условиях составляло 22-27 минут. Содержание мономера ТАП рассчитывали по следующей формуле:

$$X(\text{мон}) = \frac{S(\text{мон}) * 100}{\sum S(\text{общ})},$$

Где X (мон) – содержание мономера ТАП в процентах

S (мон) – площадь пика мономера на хроматограмме испытуемого раствора

$\sum S(\text{общ})$ – сумма площадей всех пиков на хроматограмме испытуемого раствора, за исключением пиков, присутствующих в растворе плацебо.

2.1.13. Определение содержания двуцепочечной и одноцепочечной формы ТАП

Для определения содержания ДЦ и ОЦ форм использовали те же условия проведения ГФ-ВЭЖХ, что и для определения содержания мономера, но применяли процедуру пробоподготовки. Для этого к 0,2 мл исследуемого раствора и стандартного образца прибавляли по 0,8 мл восстанавливающего раствора состава 0,3% дитиотреитола в буфере 0,265 М NaH_2PO_4 ; 0.1% SDS; pH 6.8. Затем полученную смесь нагревали в течение 5 минут при 75-85° С, охлаждали до комнатной температуры и наносили на колонку, как описано выше.

Время удержания на колонке пика 1, соответствующего одноцепочечной форме ТАП, составляло 20–25 минут, время удерживания основного пика 2, соответствующего двуцепочечной форме ТАП, составляло 1,1–1,25 от времени удерживания основного пика 1. Содержание одноцепочечной формы рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S1 * 100}{(S1 + S2)},$$

Где X – содержание одноцепочечной формы ТАП в процентах,

S1 – площадь основного пика 1

S2 – площадь основного пика 2.

2.1.14. Количественное определение остаточных белков клон-продуцента

Количественное определение остаточных белков клеток CHO проводили методом иммуноферментного анализа с использованием набора “Immunoenzymetric Assay for the Measurement of CHO Host Cell Proteins – Catalog # F015” (Cygnus Technologies, США) согласно инструкции изготовителя. В набор входят подложки с иммобилизованными антителами к белкам CHO (стрипы), очищенные козы антитела, конъюгированные со щелочной фосфатазой (раствор 1), промывочный раствор, раствор хромогенного субстрата п-нитрофенил-фосфата

(раствор 2) и стандартные растворы белков СНО, содержащие 0, 1, 4, 20, 75 и 250 нг/мл клеточных белков СНО (СНО стандарты).

Для определения содержания остаточных белков СНО в лунки стрипов вносили в двух повторностях по 50 мкл испытуемого раствора и стандартов. Затем в каждую лунку вносили по 200 мкл раствора 1. Стрипы помещали в термостатируемый шейкер ST-3L Skyline (ELMI, Латвия) и выдерживали при температуре $24\pm 4^{\circ}\text{C}$ в течение 2 часов при постоянном встряхивании. Затем содержимое лунок осушали, каждую лунку промывали 300 мкл промывочного буфера 4 раза, каждый раз удаляя промывные воды. Затем в лунки вносили по 200 мкл хромогенного субстрата (раствора 2) и инкубировали при температуре $24\pm 4^{\circ}\text{C}$ в течение 90 минут без встряхивания. По завершении инкубации стрипы помещали в планшетный спектрофотометр SpectraMax 190 (BioRad, США) и определяли светопоглощение при длинах волн 405 и 492 нм. В качестве холостого образца использовали стандарт СНО с нулевым содержанием белков СНО.

Содержание остаточных белков СНО в исследуемом образце определяли по формуле

$$X = \frac{A}{M},$$

Где X – содержание остаточных белков клона-производителя в исследуемом образце, в нанограммах на миллиграмм целевого белка

A – содержание белков СНО в испытуемом растворе в нанограммах на миллилитр, найденное по калибровочному графику, построенному по стандартным образцам,

M – содержание ТАП в миллиграммах на миллилитр.

2.1.15. Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Электрофоретическое разделение белков проводили в 12,5% полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях с использованием электрофорезной камеры «Mini Protean Tetra Cell» (Bio-Rad, США), визуализацию

белков проводили методом окрашивания по Кумасси. Образцы подготавливали следующим образом: к 30 мкл исследуемого образца добавляли 10 мкл буфера для нанесения проб с добавлением β-меркаптоэтанола (состав: 200 мМ Трис-НСl рН 6,8, 400 мМ β-меркаптоэтанол, 4% додецилсульфат натрия, 0,01% краситель бромфеноловый синий, 40% глицерин). Нагревали в течение 5 минут при (100 ± 2) °С, затем охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали 1 минуту при 16 000 g. Полученные растворы и маркер молекулярных масс (5 мкл) вносили в лунки геля. Нагружали гель из расчета не более 500 нг белка на одну дорожку, при слишком высокой концентрации белка в исследуемом образце сокращали объем наносимого в лунку подготовленного образца. Электрофорез проводили при следующих параметрах: напряжение - 400В, сила тока - 30 мА, время приложения напряжения – до выхода бромфенолового синего из геля. Затем проводили окрашивание по Кумасси: гель заливали красителем состава 0,25% Coomassie Blue R250 0,25%, метанол 45%, уксусная кислота 10%. Окрашивание проводили в течение 5 минут при нагревании. Окрашенный гель отмывали 10% уксусной кислотой до получения прозрачного фона.

2.1.16. Определение концентрации белка

Определение концентрации целевого белка в очищенных растворах проводили спектрофотометрическим методом по светопоглощению при длине волны 280 нм на спектрофотометре Cary (Varian, США) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1см против раствора плацебо. При необходимости проводили разбавление образцов тем же буферным раствором. Проводили измерение светопоглощения трех независимо приготовленных образцов. Для расчетов использовали коэффициент экстинкции 1,86 для тенектеплазы и 1,9 для алтеплазы. Расчет проводили по формуле:

$$C, \text{ мг/мл} = \frac{(A(\text{образца}) - A(\text{плацебо})) \cdot \text{Коэфф. разведения}}{\varepsilon},$$

Где С – концентрация белка,

А – оптическая плотность образца либо раствора плацебо,

ε – коэффициент экстинкции

2.1.17. Определение активности целевого белка в субстанции готовой лекарственной формы методом лизиса фибринового сгустка

Для получения калибровочных разведений стандартный образец, имеющий активность 10 000 МЕ/мл, последовательно разводили по приведенной ниже схеме (Таблица 1).

Для получения исходного раствора исследуемого образца 5 мкл исследуемого образца добавляли к 995 мкл буфера для разведения. Из полученного раствора последовательными разведениями готовили рабочие разведения испытуемого раствора по приведенной ниже схеме (Таблица 2).

Таблица 1 – Схема разбавления калибровочного раствора при определении активности ТАП

№№ пробирок	Объем, мкл						Активность, МЕ/мл
	Исходный раствор СО ТАП	Разведение				Буфер для разведения	
		1	2	3	4		
1	14,5	-	-	-	-	985,5	145
2	-	500	-	-	-	500	72,5
3	-	-	500	-	-	500	36,2
4	-	-	-	500	-	500	18,1
5	-	-	-	-	500	500	9,06

Таблица 2 – Схема разбавления исследуемого образца при определении активности ТАП

№ пробирок	Объем, мкл				Кратность разведения
	Исходный раствор образца	Разведение		Буфер для разведения	
		1	2		
1	20	-	-	980	10000
2	-	500	-	500	20000
3	-	-	500	500	40000

В стеклянные пробирки вносили 1 мл раствора фибриногена и 20 мкл раствора плазминогена. Полученный раствор перемешивали и помещали в ледяную баню. Другой набор стеклянных пробирок маркировали в соответствии с разведением стандартного или испытуемого образцов, вносили 500 мкл раствора тромбина и 500 мкл соответствующего образца, перемешивали и помещали в ледяную баню. По 200 мкл полученного раствора добавляли в пробирки, содержащие смесь плазминоген/фибриноген. Время добавления раствора фиксировали. Полученную смесь прерывисто перемешивали на вортексе Vortex-Genie 2 G560E (Scientific Industries, США) в течение 15 секунд и помещали пробирки в водяную баню с температурой $37 \pm 2^\circ\text{C}$. В течение приблизительно 30 секунд образовывался сгусток, внутри которого формировались пузыри. Время лизиса сгустка определяли как время от момента добавления образца в раствор до момента, когда последний пузырек поднимется на поверхность.

По первичным данным (временам лизиса сгустка) строили калибровочную кривую зависимости десятичного логарифма активности стандарта ($\lg A$) от десятичного логарифма значения времени лизиса ($\lg t$), определяли уравнение прямой данной зависимости. Для вычисления десятичного логарифма активности испытуемого образца в полученное линейное уравнение подставляли значение десятичного логарифма времени лизиса сгустка в испытуемом образце.

Активность ТАП рассчитывали по формуле:

$$A = 10^x * D,$$

Где x – значение десятичного логарифма активности образца, полученное из уравнения калибровочной кривой, в миллионах МЕ на миллилитр

D – кратность разведения образца.

Итоговое значение активности рассчитывают, как среднее арифметическое по значениям для каждого разведения.

2.1.18. Фотометрическое определение активности ТАП

Использовали набор реактивов «Human tPA Chromogenic Activity Kit» (Assaypro, США) согласно инструкции производителя. Реакционная смесь набора содержит плазминоген и хромогенный плазмин-субстрат. Образующийся при реакции ТАП с плазминогеном плазмин реагирует с хромогенным субстратом с образованием паранитроанилина. Скорость изменения значения абсорбции реакционного раствора прямо пропорциональна ферментативной активности ТАП. Определение активности проводили кинетическим методом с записью возрастающей оптической плотности при длине волны 405 нм в течение 50 минут на спектрофотометре SpectraMax 190 (BioRad, США).

2.1.19. Измерение уровня глюкозы и лактата в культуральной жидкости

Определение концентрации глюкозы и лактата проводили на автоматическом чиповом анализаторе Biosen C-line (EKF–diagnostic GmbH, Германия). Измерение основывается на электрохимическом методе анализа с помощью специально разработанных для этих целей чип-сенсоров. Проба подается на чип-сенсоры, где D-глюкоза и L-лактат, содержащиеся в пробе, преобразовываются ферментативно с помощью иммобилизованного фермента глюкозооксидазы / лактатоксидазы. В результате реакции выделяется глюконовая кислота / пировиноградная кислота и перекись водорода. Перекись водорода регистрируется электродом. Результатом измерения является электрический ток, который пропорционален концентрации глюкозы.

2.1.20. Определение pO_2 , pCO_2 , концентрации глутамина, глутамата, ионов аммония, калия и натрия

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

2.1.21. Определение концентрации и жизнеспособности клеток

Концентрацию клеток определяли методом подсчета в камере Фукса-Розенталя. Жизнеспособность клеток определяли методом исключения красителя трипанового синего. Живые клетки не проницаемы для красителей, а мертвые клетки проницаемы и окрашиваются. Для определения количества живых клеток суспензию клеток (~40мкл) смешивали с равным количеством 0.4% (w/v) раствора красителя в буфере HBSS (Sigma, США) и вносили под покровное стекло камеры. Жизнеспособность определяли по формуле

$$X = \frac{A}{B},$$

Где X – доля жизнеспособных клеток,

A – количество неокрашенных клеток

B – общее количество учтенных клеток.

2.1.22. Определение содержания сиаловых кислот в белках

Определение содержания сиаловых кислот в белках проводили спектрофотометрически резорциноловым методом Свеннерхольма на спектрофотометре SpectraMax 190 (BioRad, США). Вносили в полипропиленовые микропробирки по 100 мкл растворов, содержащих 75, 50, 40, 25, 20, 10 мкг/мл NANA, испытуемый раствор, воду очищенную, добавляют по 20 мкл 40 мМ HIO₄, перемешивали и инкубировали 35 мин. на льду. Добавляли по 250 мкл резорцинолового реагента, перемешивали и инкубировали на льду 5 мин, после чего пробирки переносили в термостат, предварительно нагретый до 95°C инкубировали 15 мин. Пробирки охлаждали на воздухе в течение 15 мин, добавляли по 250 мкл этилового спирта, перемешивали и выдерживали 3 минуты при 37°C и 5 минут при комнатной температуре, проводили измерения оптической плотности растворов при длине волны 600 нм.

По растворам стандартных образцов NANA строили калибровочный график зависимости оптической плотности от содержания NANA, по которому определяли

содержание NANA в исследуемых образцах, используя для расчетов следующие молекулярные массы:

- Сиаловая кислота 310;
- Алтеплаза 59050
- Тенектеплаза 58776.

2.1.23. Определение содержания ДНК методом ПЦР в реальном времени.

При определении остаточной ДНК клона-продуцента использовали метод количественного ПЦР в реальном времени (qPCR). В количественной полимеразной цепной реакции использовали систему Taqman (Thermo Fisher Scientific), где при размножении специфической последовательности ДНК-полимераза расщепляет зонд, что приводит к увеличению флюоресценции. Для детекции ДНК клона-продуцента СНО использовали набор праймеров и зонда RepA. Образцы экстрагировали с использованием набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия). Для контроля экстракции ДНК использовали аналогичный объём образца с добавлением известного количества ДНК (контрольные образец «+ДНК»). Данные контрольные образцы использовали для расчета коэффициента извлечения ДНК.

Объём для выделения – 0,2 мл; конечный объём при элюции – 0,1 мл; в реакцию qPCR (лунку) добавляли 0,005 мл элюата. Количество повторов (лунок) для каждого образца – 3. Количество ДНК, добавляемое в контрольные образцы «+ДНК», – 10 пг (до конечной концентрации 50 пг/мл).

Расчет концентрации остаточной ДНК в образцах после разведения

$$Q = \frac{A \times V_{\text{элюции}}}{V_{\text{образца}} \times V_{\text{пцр}}}$$

Где:

Q – концентрация ДНК в испытуемом образце после разведения (пг/мл);

A – среднее (по 3 повторам) количество ДНК в образце (пг);

Vобразца - объём образца, взятый для выделения (мл);

$V_{\text{пцр}}$ – объём элюата, внесенного в ПЦР пробирку (мл);

$V_{\text{элюции}}$ – объём элюции (мл).

Анализ каждого образца проводили в трех повторностях. Полученные результаты усреднены (A). Если полученные значения ниже 0,156 пг в лунке, то количество ДНК ниже предела количественного обнаружения. В дальнейших расчетах полученные значения принимали как «менее 0,0313 пг/мкл».

Расчет коэффициента извлечения (R)

$$R = \frac{Q(\text{контр.}) - Q}{Q(\text{извест.})}$$

Где:

R – коэффициент извлечения;

Q (контр.) – концентрация ДНК в образце «+ДНК» (пг/мл);

Q – концентрация ДНК в испытуемом образце после разведения (пг/мл);

Q (извест.) – известное количество ДНК в образце «+50пг/мл ДНК» (пг/мл).

Если Q (концентрация ДНК в испытуемом образце после разведения) ниже предела количественного обнаружения, то для расчета R (коэффициента извлечения) Q принимали за 0.

Расчет концентрации ДНК в образцах:

$$C = \frac{Q \times C(\text{белка исх.})}{R \times C(\text{белка разв.})}$$

Где: C – концентрация остаточной ДНК в образце (пг/мл);

Q – концентрация ДНК в испытуемом образце после разведения (пг/мл);

C (белка разв.) – концентрация белка в образце после разведения (мг/мл);

C (белка исх.) – исходная концентрация белка в образце (мг/мл);

R – коэффициент извлечения.

Если коэффициент извлечения (R) входит в диапазон 80-120%, то при расчете концентрации ДНК в образцах R не используется.

Расчет содержания ДНК в образцах:

$$X = \frac{C}{C(\text{белка исх.})}$$

Где:

X – Содержание ДНК в испытуемом образце (пг/мг белка);

C – концентрация остаточной ДНК в образце (пг/мл);

C (белка разв.) – концентрация белка в образце после разведения (мг/мл).

2.2. Результаты и обсуждение

2.2.1. Оценка критичности показателей качества разрабатываемых препаратов.

Биофармацевтические препараты имеют множество показателей качества, которые в разной степени влияют на сопоставимость биоаналога с оригинальным препаратом. Биоэквивалентность подразумевает отсутствие клинически значимых различий в профиле безопасности и эффективности двух лекарственных препаратов [138], то есть сходство показателей критических параметров качества.

Критичность параметра качества препарата может быть определена как степень влияния параметра на безопасность и эффективность лекарственного препарата. Согласно принципам, изложенным в ICH Q9 [139] и «A-mab case study» [140], параметры качества необходимо идентифицировать, классифицировать и ранжировать на основании имеющихся научных знаний, лабораторных данных, данных доклинических и клинических исследований. Разработка стратегии контроля параметров качества строится на основании определения критических параметров.

В настоящем исследовании определение критических показателей качества, влияющих на биоэквивалентность препаратов алтеплазы и тенектеплазы, было проведено при помощи метода ранжирования рисков [139].

Показатели качества можно разделить на продукт-связанные, процесс-связанные и обязательные критические параметры качества субстанции (табл. 3) [141]. Критические продукт-связанные показатели качества препаратов алтеплазы и тенектеплазы в основном связаны с их биологической активностью (способностью связывать фибрин и инициировать тромболизис) и временем полувыведения: факторами, влияющими на терапевтическую эффективность этих лекарственных средств. Продукт-связанные показатели качества с максимальным

уровнем риска для ТАП это тромболитическая активность, содержание мономера целевого продукта, и, по литературным данным, содержание сиаловых кислот [7].

Точные количественные показатели, характеризующие структуру молекулы, но не влияющие напрямую на профили активности и безопасности, имеют меньший уровень риска. При этом следует учитывать, что одни показатели напрямую влияют на другие, так, количество полос при изоэлектрическом фокусировании взаимосвязано с количеством зарядовых изоформ, а значит с содержанием сиаловых кислот в гликоцепях.

Критические процесс-связанные показатели качества препаратов алтеплазы и теноктеплазы характеризуют количество и состав примесей различного характера, и связаны с профилем безопасности и иммуногенности препарата. К процесс-связанным показателям качества относятся содержание остаточных белков и ДНК продуцента.

Такие параметры качества как содержание целевого белка, внешний вид, стерильность и наличие случайных агентов, вследствие своей высокой критичности для эффективности и безопасности продукта классифицируется как обязательные критические параметры качества по умолчанию. Эти параметры качества не оцениваются методом ранжирования и оценки риска. Им априори назначается наивысшая оценка критичности.

Каждый параметр качества оценивался на критичность с использованием метода ранжирования рисков [139], в котором определяется возможное влияние каждого параметра на безопасность и эффективность. Ранг параметра определялся двумя факторами: воздействием и неопределенностью этого воздействия (Таблица 4, 5).

Воздействие. Оценка воздействия оценивает известные или потенциальные последствия для безопасности и эффективности. В рейтинге учитывается влияние параметра на эффективность, основанную на клиническом опыте или результатах анализа активности; фармакокинетику/фармакодинамику (ФК/ФД);

иммуногенность; безопасность. Оценка воздействия определяет известные или потенциальные последствия для безопасности и эффективности по 20-балльной шкале, где 2 – нет воздействия, а 20 – очень значительное воздействие.

Таблица 3 – Разделение параметров качества субстанций pTAP по категориям

<p>Варианты целевого белка</p> <p>Фрагменты</p> <p>Агрегаты</p> <p>ОЦ/ДЦ форма</p> <p>Варианты гликозилирования</p> <p>Уровень специфической активности</p>	<p>Примеси, связанные с процессом</p> <p>ДНК</p> <p>Белки клетки хозяина</p>
<p>Обязательные критические параметры качества субстанции</p> <p>pH</p> <p>Прозрачность</p> <p>Цветность</p> <p>Осмоляльность</p> <p>Концентрация TAP</p> <p>Концентрация и качество вспомогательных веществ</p> <p>Микробиологическая чистота</p> <p>Содержание эндотоксинов</p> <p>Фасовка и хранение</p>	

Неопределённость. Неопределенность ранжирования основана на обоснованности информации, используемой при назначении категории воздействия. Определяется по 7-балльной шкале, где 1 – воздействие установлено в ходе клинических исследований, 7 – нет информации.

Таблица 4 – Определение уровней риска критических продукт-связанных параметров качества рТАП. ФК/ФД – фармакокинетика, фармакодинамика, В – воздействие; Н – неопределенность. Предел критичности – 28.

Показатель качества	Эффективность		ФК/ФД		Иммуногенность		Безопасность		Уровень риска
	В	Н	В	Н	В	Н	В	Н	
Тромболитическая активность	20	3	16	3	4	3	4	2	60
Содержание мономера	20	3	12	5	12	2	10	2	60
Содержание сиаловых кислот	20	3	16	3	4	3	12	1	60
Содержание одноцепочечной формы	4	1	4	1	2	1	2	1	4

Таблица 5 – Определение уровней риска критических процесс-связанных параметров качества рТАП. ФК/ФД – фармакокинетика, фармакодинамика, В – воздействие; Н – неопределенность. Предел критичности – 28.

Показатель качества	Эффективность		ФК/ФД		Иммуногенность		Безопасность		Уровень риска
	В	Н	В	Н	В	Н	В	Н	
Содержание ДНК	2	3	2	3	4	3	20	3	60
Содержание белков СНО	2	3	2	3	20	3	20	3	60

Баллы уровня риска определяются как произведение баллов Воздействия и Неопределенности, уровень риска определяется по наивысшему количеству баллов уровня риска для каждого из показателей качества. Так, повышенное содержание примесных белков оказывает малое воздействие на биологическую активность препаратов ТАП (воздействие*неопределенность=6), однако может вызвать

аллергические реакции у пациентов (воздействие*неопределенность =60). Поэтому содержание белков клона-производителя является критическим параметром качества с высоким уровнем риска.

Согласно проведенной оценке рисков, параметры биологической активности ТАП, содержания мономеров целевого белка, содержания сиаловых кислот в гликанах, а также содержание ДНК и белков клеток-производителей характеризуются значимым уровнем риска.

2.2.2. Определение влияния изоформного состава на биологическую активность алтеплазы и тенектеплазы

При первичном отборе клонов-производителей тенектеплазы было обнаружено, что белок, производимый лидерными клонами, обладает сниженной фибринолитической активностью по сравнению с оригинальным препаратом. Также зафиксировано повышенное содержание сиаловых кислот в гликанах молекул тенектеплазы по сравнению с оригинальным препаратом (Таблица 6, Рисунок 3).

Повышенная степень сиалирования может негативно влиять на активность тенектеплазы [7]. В статье описывается сравнение Метализе (тенектеплазы производства Берингер Ингельхайм, Германия) и Элаксима (тенектеплазы, Ген-пова, Индия). Показано, что Элаксим обладает сниженной на 20% относительно оригинального препарата активностью. При этом параметры содержания мономера, чистоты по данным SDS-PAGE, содержания ОЦ/ДЦ форм тенектеплазы, занятости сайтов гликозилирования в обоих препаратах были близки. Потенциальный биоаналог отличался от оригинального препарата повышенным содержанием сиаловых кислот (5 мол.NANA/ мол. против 3,6 мол.NANA/ мол. в оригинальном препарате), и, как следствие, высоким содержанием кислых изоформ. Авторы статьи делают вывод о связи повышенного содержания сиаловых кислот в гликанах и сниженной тромболитической активности тенектеплазы.

В патенте EP 0420833A1 [142] сообщается, что обработка молекулы ТАП нейраминидазой, отщепляющей концевые сиаловые кислоты гликанов, и, таким образом, снижающей степень сиалирования молекулы, позволяет повысить ее активность. Это так же демонстрирует связь содержания сиаловых кислот в гликанах и биологической активности ТАП.

Для определения степени влияния, оказываемого сиаловыми кислотами на активность вариантов рТАП, диссертантом была проведена серия дополнительных исследований.

Проведен эксперимент с обработкой высокосиалированной тенекеплазы нейраминидазой и показано, что биологическая активность десиалированной тенекеплазы возрастает на 154% (Таблица 6).

Таблица 6 – Степень сиалирования и удельная активность различных образцов тенекеплазы.

Образец	Содержание сиаловых кислот, мол.NANA/ мол. тенекеплазы	Удельная активность, млн МЕ/мг
1. Оригинальный препарат Метализе (Берингер Ингельхайм)	3,6 ± 0,5	0,66 ± 0,05
2. Тенекеплаза, полученная от клонов первого раунда отбора	4,31–6,13	0,45–0,6
3. Тенекеплаза, полученная от клона mp 47, до ремоделирования нейраминидазой	4,31	0,45
4. Тенекеплаза, полученная от клона mp 47, ремоделированная нейраминидазой	0,5	0,69

Для исследования связи количества сиаловых кислот в гликанах ТАП и биологической активности активаторов плазминогена были получены

десиалированные (0-1 мол.NANA/ мол.), гиперсиалированные (4,5-6 мол.NANA/ мол.) и умеренно сиалированные варианты алтеплазы и теноктеплазы. Сравнение активности различных форм теноктеплазы приведено на Рисунке 4. Линейная регрессия полученных данных показала тенденцию к зависимости активности теноктеплазы от степени сиалирования молекулы. Теноктеплаза, имеющая более 5 молекул сиаловых кислот в гликоцепях, имела активность ниже целевого диапазона. Эти данные подтверждают результаты приведенных выше исследований [7] и [142]. Сиалирование теноктеплазы признано продукт-связанным критическим показателем качества с максимальной степенью риска.

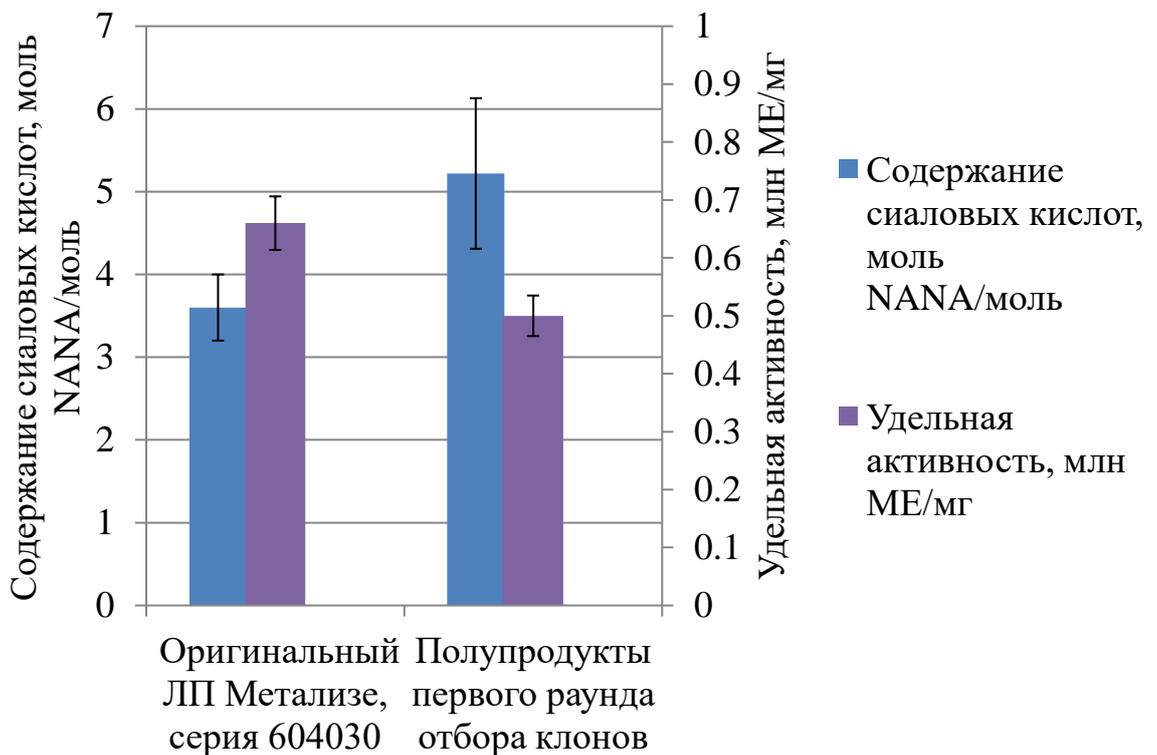


Рисунок 3 – Сравнение активности и сиалирования оригинального препарата Метализе и теноктеплазы, полученной от клона первого раунда селекции.

В отличие от теноктеплазы, при изучении спектра вариантов сиалирования алтеплазы не было выявлено зависимости активности алтеплазы от степени сиалирования. (Рисунок 5). Вероятно, это связано с тем, что алтеплаза, являясь

продуктом естественного отбора (в отличие от мутантной формы тенектеплазы), представляет собой более стабильную и надежную структуру. Таким образом, для алтеплазы степень сиалирования не является критическим показателем качества с максимальной степенью риска.

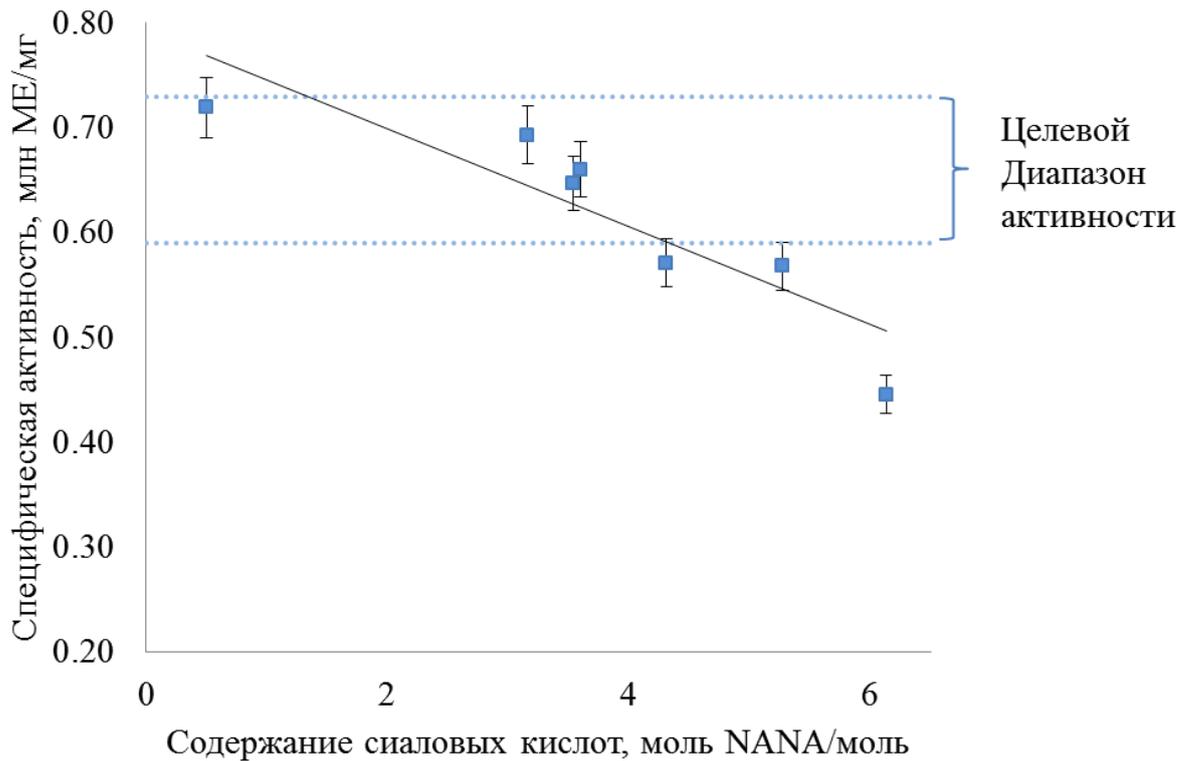


Рисунок 4 – Варианты сиалирования тенектеплазы и их биологическая активность

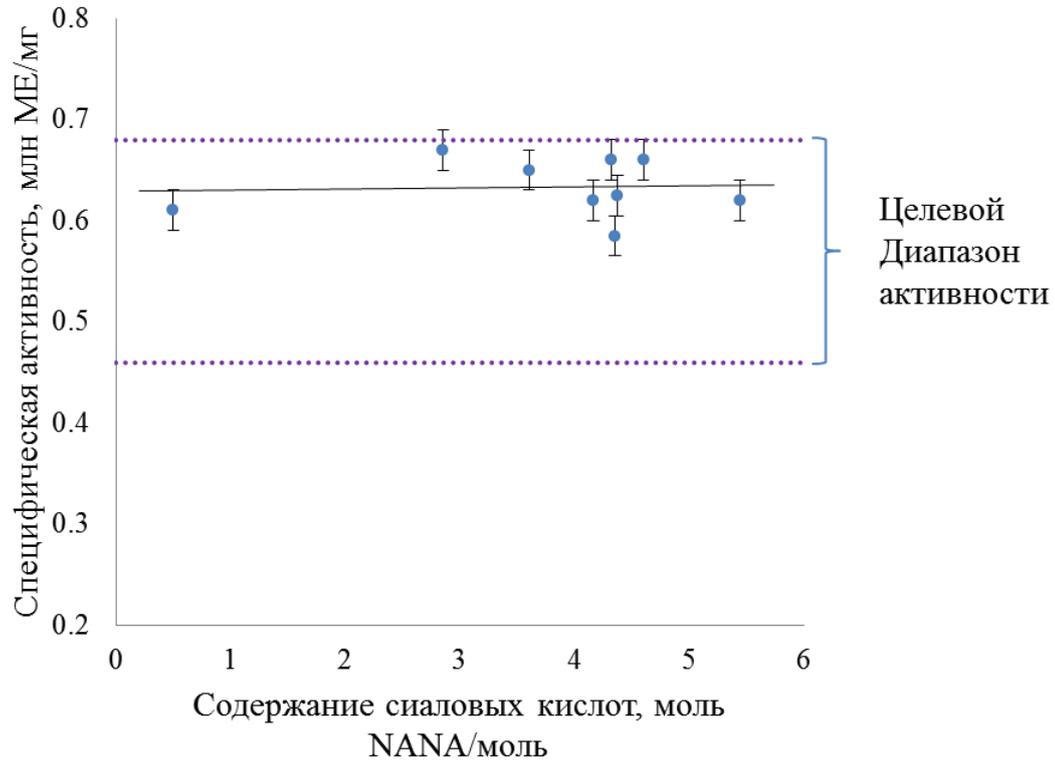


Рисунок 5 – Варианты сиалирования алтеплазы и их биологическая активность

2.2.3. Определение целевого профиля качества препаратов

На основании проведённой оценки критичности параметров качества алтеплазы и теноктеплазы, а также результатов анализа 4 серий каждого из оригинальных препаратов и нормативов, установленных производителем в спецификациях, были определены целевые профили качества препаратов и допустимые диапазоны для каждого из параметров (Таблица 7).

Таблица 7 – Целевые профили качества алтеплазы и тенектеплазы

Наименование показателя, размерность	Лекарственный препарат	Диапазон значений параметров качества	
		Специфицированный	Установленный для разработки
Содержание мономера, %	Тенектеплаза	не менее 95	Не менее 96
	Алтеплаза		
Активность, тыс. МЕ/мг	Тенектеплаза	590–730	610–710
	Алтеплаза	460–670	480–650
Содержание ОЦ формы, %	Тенектеплаза	не менее 60	не менее 60
	Алтеплаза		
Содержание белков клетки-хозяина, нг/мг	Тенектеплаза	не более 100	Не более 90
	Алтеплаза	не более 20	Не более 16
Содержание ДНК клетки-хозяина, пг/мг	Тенектеплаза	не более 50	не более 50
	Алтеплаза		
Содержание сиаловых кислот, моль NANA / моль	Тенектеплаза	3,6 ± 0,6	3,6 ± 0,4
	Алтеплаза	2–4	2–4

Для параметров качества с максимальной степенью риска (активность, содержание мономера) диапазон разработки был установлен аналогичным диапазоном варьирования внутри серий референтных препаратов.

2.2.4. Разработка технологии получения препарата алтеплазы

2.2.5. Отбор клонов-продуцентов алтеплазы

Первичный отбор клона-продуцента алтеплазы проводился с учетом наибольшей продуктивности и активности алтеплазы. Наиболее продуктивные клоны отбирались для культивирования в малых биореакторах в периодическом

режиме и переводились на бессывороточную питательную среду. Для адаптации клеток штамма-продуцента к бессывороточной среде выбрана питательная среда SFM4CHO, позволяющая получить достаточно высокую клеточную плотность и продуктивность, и при этом относительно недорогая.

2.2.5.1. Разработка аналитической методики очистки алтеплазы

Для очистки ТАП компанией Thermo Fisher Scientific совместно с МБЦ Генериум разработан пептидный аффинный сорбент на агарозной матрице CaptureSelect tPA. Лиганд данного сорбента представляет собой аффинный пептид, созданный на основе вариабельного домена тяжелой цепи антитела верблюдовых. Для создания аффинного лиганда лам иммунизировали алтеплазой и получали библиотеку антител, затем антитела отбирали методом фагового дисплея по параметрам аффинности, прочности связывания, стабильности. Участки генов, кодирующих вариабельные области выбранных антител, клонировали в клетки дрожжей. Полученный при культивировании дрожжевого продуцента пептидный лиганд конъюгировали с агарозной матрицей. [149].

В рамках совместных исследовательских работ с компанией Thermo Fisher Scientific дисертант проводил сравнение полученных описанным способом прототипов аффинных сорбентов для алтеплазы, содержащих в качестве лиганда пептиды с различной структурой. В работе использовали 5 различных прототипов сорбентов. Сравнительные эксперименты проводили с использованием колонн Tricorn 10 (объем колонны 2 мл). Для оценки емкости исследуемых прототипов на каждую колонну наносили раствор очищенного препарата алтеплазы до начала роста оптической плотности (280 нм), далее отмывали колонну стартовым буферным раствором, после чего проводили элюцию алтеплазы буферным раствором с пониженным рН. На рисунке 6 представлен типичный вид хроматограммы, получаемой в процессе исследования.

Количество алтеплазы в целевом пике оценивали по светопоглощению при длине волны 280 нм. Результаты оценки емкости по целевому белку пяти прототипов аффинных сорбентов представлены на рисунке 7.

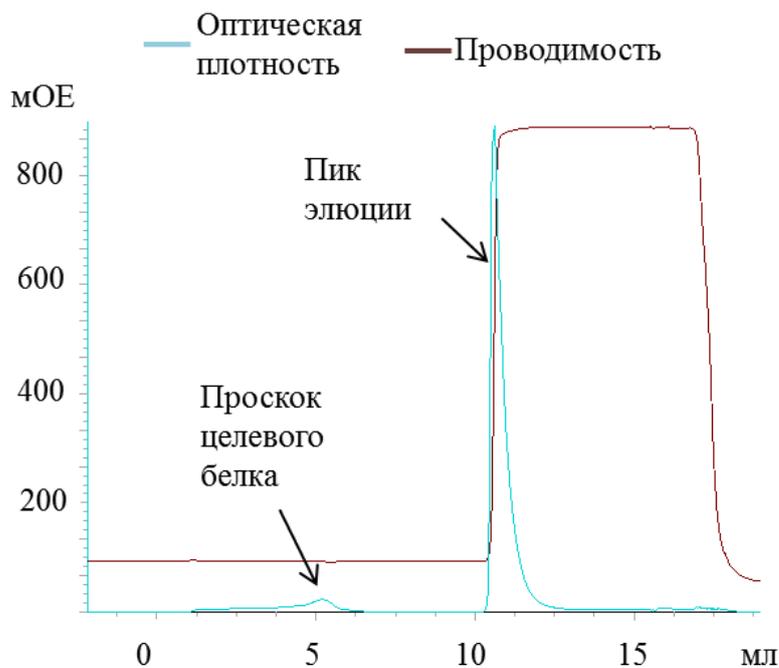


Рисунок 6 – Типичный вид хроматограммы при оценке емкости прототипов сорбентов с использованием предварительно очищенного материала, метод 10% проскока. Обозначены проскок целевого белка при перегрузе колонны и пик при элюции целевого белка.

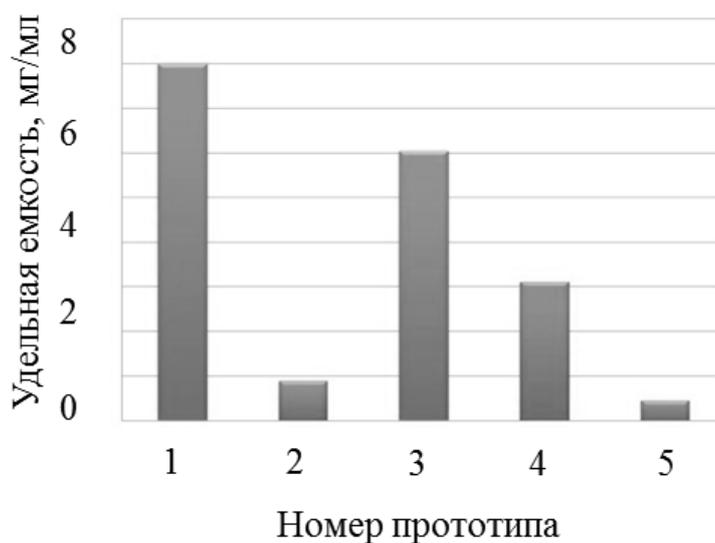


Рисунок 7 – Сравнение удельной емкости прототипов аффинных сорбентов.

Наилучшей емкостью обладают прототипы #1 и #4.

Наилучшей емкостью обладали прототипы #1 и #4. С данными прототипами был проведен дополнительный эксперимент по определению динамической емкости по отношению к целевому белку. В эксперименте на уравновешенную колонну наносили раствор очищенной алтеплазы до момента детекции целевого белка в проскоке нанесения в концентрации 10 % от концентрации в стартовом материале. Далее колонну с адсорбированным белком отмывали стартовым буферным раствором, связавшуюся алтеплазу элюировали элюирующим буферным раствором. Тестирование указанных сорбентов проводили при различном времени контакта с наносимым материалом. Полученные результаты представлены на рисунке 8.

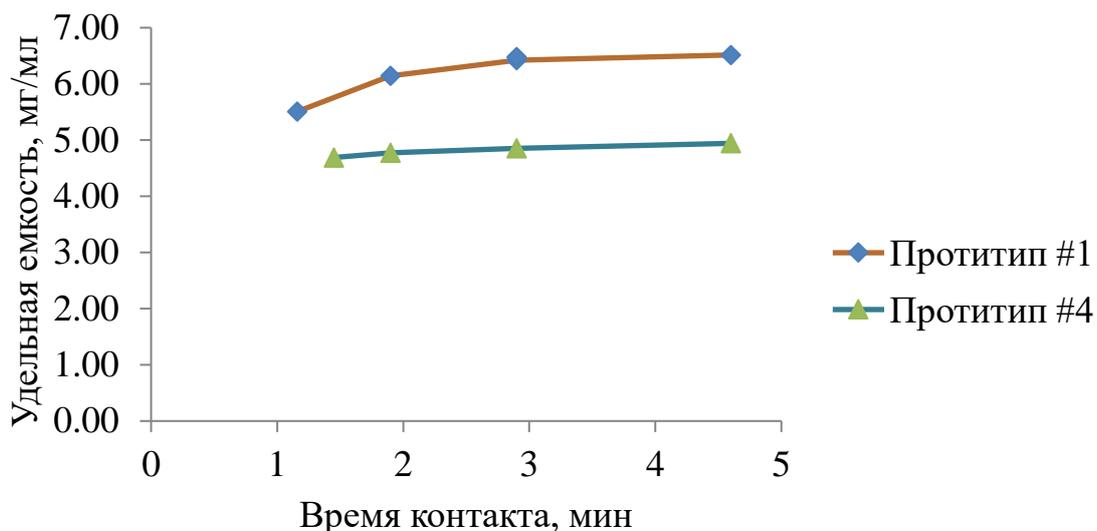


Рисунок 8 – Сравнение динамической емкости прототипов аффинного сорбента #1 и #4

Динамическая емкость прототипа #1 составила от 5,51 до 6,52 мг/л при времени контакта от 1 до 4,5 минут. Динамическая емкость прототипа #4 составила от 4,69 до 4,94 мг/мл. Приведенные данные указывают на высокую аффинность выбранных прототипов по отношению к молекуле алтеплазы. Увеличение времени контакта свыше трех минут не приводило к значительному увеличению емкости сорбента.

С учетом полученных результатов компанией Thermo Fisher Scientific был произведен финальный вариант аффинного сорбента CaptureSelect tPA. Проведенное нами исследование показало, что динамическая емкость данного сорбента составляет 10 мг/мл при времени контакта 4 мин. На рисунке 9 представлены результаты по сравнительному изучению динамической емкости прототипа #1 и сорбента CaptureSelect tPA при различном времени контакта.

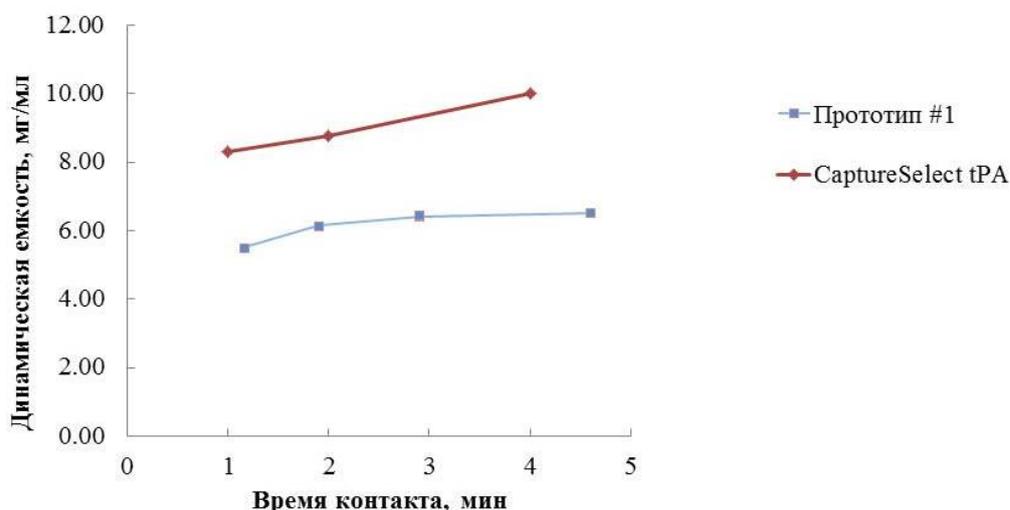


Рисунок 9 – Сравнение динамической емкости прототипа аффинного сорбента #1 и аффинного сорбента Capture Select tPA

На следующем этапе нами была произведена разработка условий одностадийной аналитической очистки алтеплазы на CaptureSelect tPA. Основной задачей данного этапа работы была разработка точного и высокопроизводительного метода оценки количественного содержания целевой мономерной формы алтеплазы в культуральной жидкости.

Скрининг условий продемонстрировал, что оптимальной методикой аналитической очистки алтеплазы на аффинном сорбенте является следующая последовательность действий:

- уравновешивание колонны стартовым буфером с нейтральным рН;
- нанесение культуральной жидкости;
- отмывка колонны стартовым буфером от несвязавшихся компонентов культуральной жидкости;
- отмывка колонны от примесных веществ, связавшихся с сорбентом, при помощи растворов, содержащих NaCl в концентрации до 2М;

•элюция целевого белка буферным раствором, имеющим рН 3,0-4,0, и содержащим аргинин в концентрации до 0,4 М или мочевины в концентрации до 2 М в качестве стабилизирующих агентов.

Типичная хроматограмма очистки алтеплазы на аффинном сорбенте по описанной схеме приведена на рисунке 10.

На рисунке 11 представлена ГФ-ВЭЖХ - хроматограмма образцов, полученных в процессе выделения алтеплазы из культуральной жидкости на аффинном сорбенте CaptureSelect tPA, и препарата «Актилизе» (производитель Beringer Ingelheim).

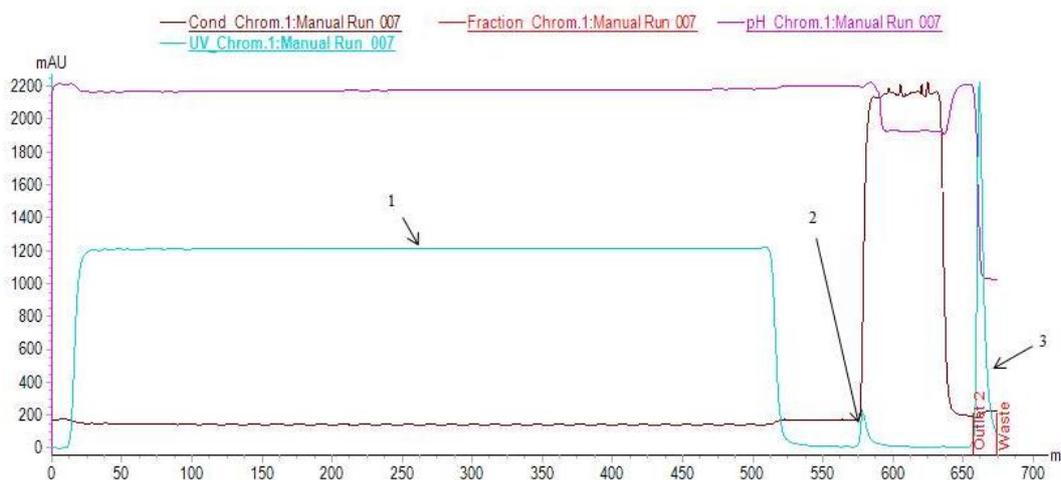


Рисунок 10 – Типичный вид хроматограммы при определении концентрации алтеплазы в КЖ при помощи аналитической хроматографии на сорбенте Capture Select tPA. 1 – пропуск не связавшихся с колонной примесей, 2 – отмывка связавшихся с колонной примесей, 3 – элюция целевого белка.

По данным ГФ-ВЭЖХ, очищенные на CaptureSelect tPA образцы алтеплазы имели содержание мономера выше 95% и были сравнимы по содержанию мономера с референтным препаратом. Полученные данные свидетельствуют о том, что разработанная схема очистки алтеплазы на аффинном сорбенте позволяет выделять целевую мономерную форму алтеплазы.

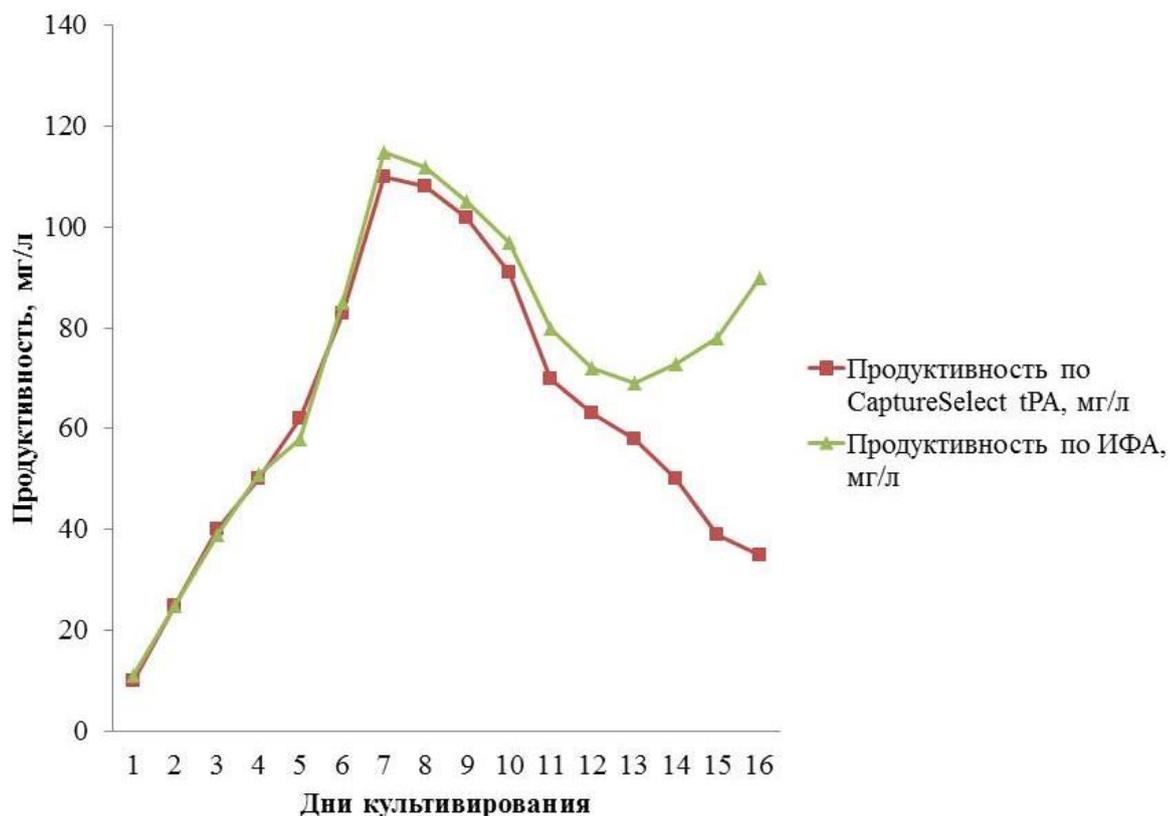


Рисунок 12 – Сравнение оценок продуктивности перфузионного культивирования алтеплазы, полученных методами ИФА и хроматографии на аффинном сорбенте CaptureSelect tPA.

При оценке содержания белка в перфузате методом ИФА максимальная концентрация в образце составила 130 мг/мл, при оценке методом хроматографии с использованием аффинного сорбента – 121 мг/л. Измеренные значения концентрации алтеплазы указанными методами близки на отрезке с 1 по 12 день культивирования. После 12 дня культивирования расхождение в графиках продуктивности приобретают очевидный характер. Так, на 15-й день культивирования разница продуктивности в зависимости от метода оценки составляла 39 мг/л. Данное явление объяснялось накоплением фрагментов целевого белка в культуральной жидкости. Электрофорез в ПААГ образцов культуральной жидкости (Рисунок 13) подтвердил накопление фрагментов алтеплазы массой 10–20 кДа, особенно активное после 12 суток культивирования.

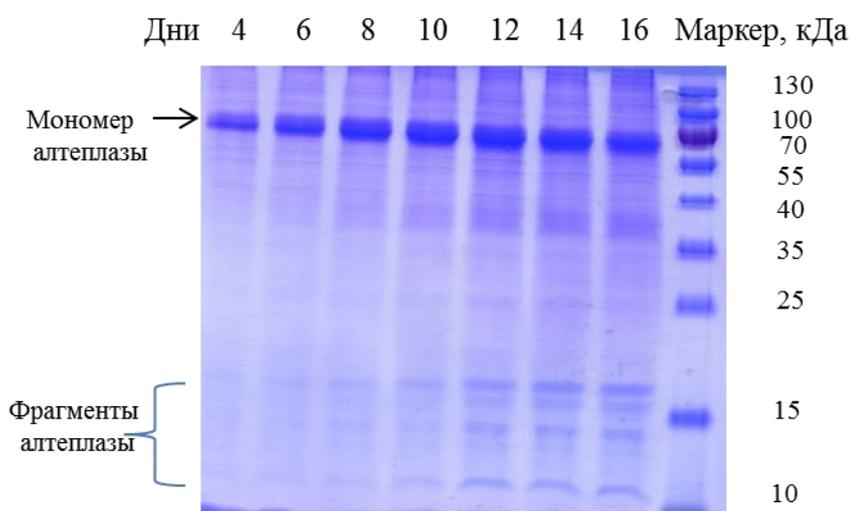


Рисунок 13 – Электрофореграмма образцов культуральной жидкости при культивировании продуцента алтеплазы на 4 – 16 день перфузионного культивирования. Видно нарастание количества фрагментов массой 10-20 кДа

2.2.5.2. Разработка технологии непрерывного культивирования продуцента алтеплазы

Алтеплаза еще более, чем теноктеплаза, склонна к образованию агрегатов и преципитатов в отсутствие стабилизаторов (аргинина, мочевины), и ее накопление в КЖ в высоких концентрациях может привести к потерям продукта вследствие преципитации. По этой причине непрерывное перфузионное культивирование является предпочтительным методом для культивирования продуцента алтеплазы. Для повышения жизнеспособности и продуктивности культуры, минимизации протеолитической деградации, в том числе образования двуцепочечной формы, в условиях псевдо-перфузии в колбах Эрленмейера исследованы варианты культивирования с суточной кратностью перфузии 0,25 и 1 объем реактора. При этом определяли концентрацию клеток, жизнеспособность и продуктивность (Рисунок 14).

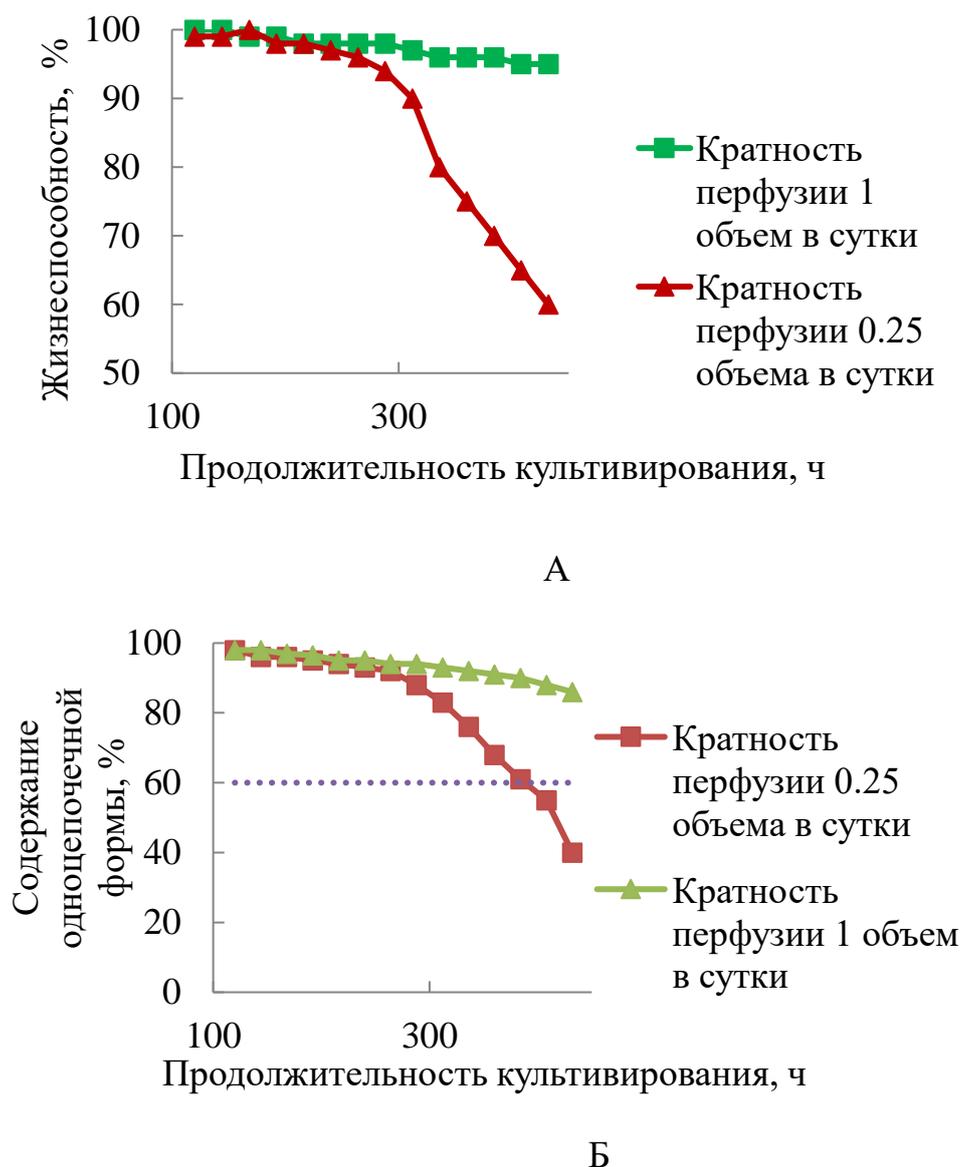


Рисунок 14 – Сравнение характеристик процесса культивирования продуцента алтеплазы в условиях суточной перфузии кратностью 0,25 и 1 объем реактора.

А – зависимость жизнеспособности культуры от продолжительности культивирования; Б – зависимость содержания ОЦ формы алтеплазы от продолжительности культивирования.

Увеличение кратности перфузии с 0,25 до 1 от объема реактора в сутки позволило увеличить клеточную плотность культуры с $6 \cdot 10^6$ кл/мл до $16 \cdot 10^6$ кл/мл, и примерно в 4 раза увеличить суточный выход алтеплазы из реактора. При перфузии 1 объем реактора в сутки жизнеспособность клеток за 13 суток

культивирования не опускалась ниже 90% и на завершающих этапах культивирования значительно превосходила жизнеспособность при перфузии в режиме 0,25 объема реактора в сутки.

2.2.5.3. Масштабирование технологии непрерывного культивирования продуцента алтеплазы

Для масштабирования перфузионного процесса культивирования продуцента алтеплазы было проведено культивирование в реакторе рабочим объемом 3 л с мешалкой и внешней перфузионной системой XCell ATF2 (Repligen, США). Затем процесс был масштабирован далее до объема 100 л в биореакторе SUB100 с перфузионной системой XCell ATF6 (Repligen, США). В данных процессах динамика концентрации клеток, жизнеспособности и продуктивности была схожей (Таблица 8).

Таблица 8. Сравнение параметров культивационного процесса продуцента алтеплазы в 3 л и 100 л реакторе.

Параметр	Объем реактора, л	
	3	100
Перфузионное устройство	ATF2	ATF6
Максимальная концентрация клеток, 10 ⁶ кл/мл	17 ± 2	16 ± 2
Жизнеспособность в последние (17-е) сутки, %	86 ± 5	84 ± 5
Удельная активность целевого белка, млн МЕ/мг	610 ± 40	600 ± 40
Пиковая продуктивность алтеплазы, мг/л	146 ± 10	153 ± 12
Средняя продукция алтеплазы, мг/л	72 ± 7	77 ± 10

В масштабированном до 100 л процессе непрерывного культивирования продуцента алтеплазы со скоростью протока среды 1 объем реактора в сутки

средняя продуктивность процесса за 17 суток составила 77 ± 10 мг/л, пиковая продуктивность составила 153 ± 12 мг алтеплазы на литр культуральной жидкости.

2.2.5.4. Разработка препаративной методики очистки алтеплазы

Условия очистки алтеплазы на аффинном сорбенте Capture Select tPA были первично подобраны при разработке аналитической методики очистки. Это уравнивание колонны стартовым буфером с нейтральным pH; нанесение культуральной жидкости; отмывка колонны стартовым буфером от несвязавшихся компонентов культуральной жидкости; отмывка колонны от примесных веществ, связавшихся с сорбентом, при помощи растворов, содержащих NaCl в концентрации до 2М; и элюция целевого белка буферным раствором, имеющим pH 3,0-4,0, и содержащим аргинин в концентрации до 0,4 М. Для более эффективного удаления примесных белков были дополнительно введены промывки, содержащие до 200 мМ каприлата и до 1М мочевины. Дополнительные промывки позволили снизить количество примесных белков в элюате с 1200 нг/мг до 300 нг/мг без значительных потерь алтеплазы (Рисунок 15). По данным электрофореза можно сделать вывод, что основной объем примесных белков проходит через сорбент CaptureSelect tPA без сорбции. Примесные белки, удаляемые при дополнительных промывках, не детектировались методом электрофореза, поэтому для оценки эффективности удаления примесных белков использовали метод ИФА.

Сорбенты, используемые на стадии захвата продукта из КЖ, могут аккумулировать на себе различные компоненты КЖ вследствие неспецифических взаимодействий, поэтому для сорбентов первой стадии очистки рекомендуется регенерация и санитизация с использованием 0,5 – 1 М NaOH. Так как CaptureSelect tPA представляет собой пептидный сорбент, его санитизация растворами щелочей может привести к разрушению лиганда, поэтому было принято решение не использовать CaptureSelect tPA как сорбент стадии захвата, а применить его на последующих этапах очистки.

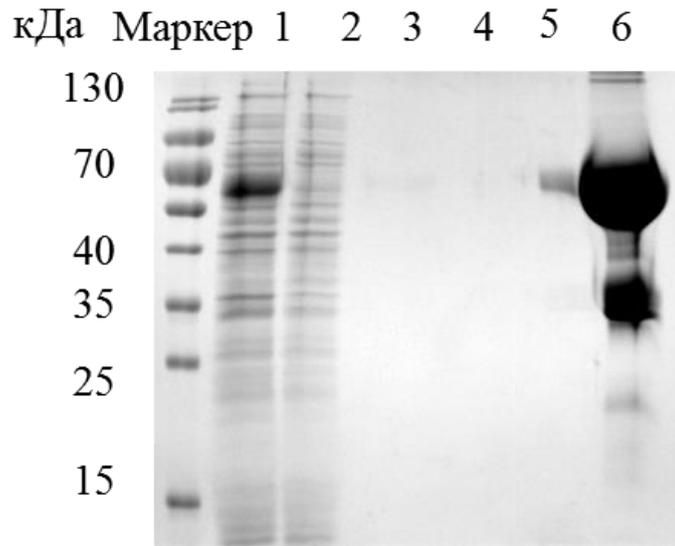
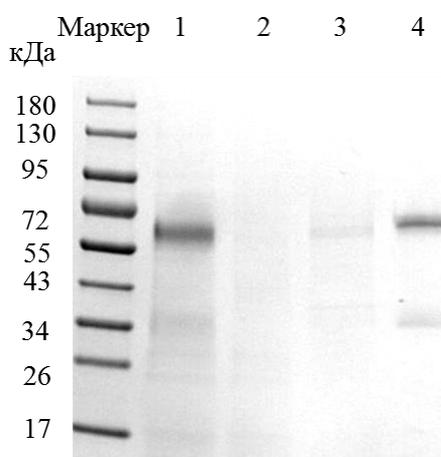
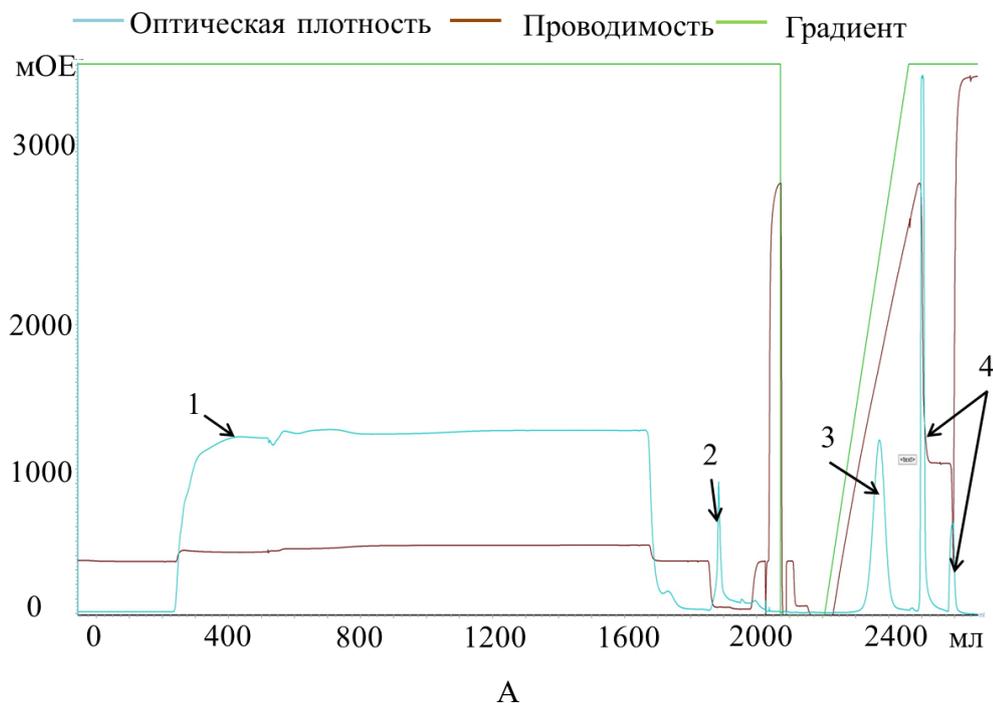


Рисунок 15. Очистка алтеплазы из КЖ на CaptureSelect tPA, электрофореграмма фракций, 1 – КЖ, 2 – проскок, 3,4,5 – промывки, содержащие 2М NaCl, 200 мМ каприлата, 1М мочевины соответственно, 6 – элюат целевого белка.

В качестве стадии захвата было решено использовать цинк-хелатную хроматографию, подобно методике, описанной в патенте RU2500817C1 [150]. ИМАС-сефарозу заменили на металлохелатный сорбент с метакрилатной матрицей EMD Chelate Fractogel (Millipore, США), так как было показано, что метакрилат связывает меньше неспецифических примесей, чем сефароза: при использовании метакрилатного сорбента, в отличие от сефарозного, окраски сорбента компонентами питательной среды не наблюдалось, а содержание примесных белков при тех же условиях проведения хроматографии снизилось в 4 раза. Алтеплаза обладает высоким сродством к хелатированному иону цинка и прочно связывается с сорбентом (по-видимому, присутствуют не только координационные, но и иные неспецифические взаимодействия), что позволяет использовать высокоселективные промывки, содержащие до 2М NaCl или до 0,1 М имидазола. Элюция целевого белка градиентом от 0 до 1 М NaCl при pH 4,0 в присутствии 1М мочевины также позволяет сократить содержание примесей

элюате: часть белков продуцента остаются связанными с ионами цинка и элюируются только при регенерации сорбента раствором ЭДТА (рисунок 16).



Б

Рисунок 16. Очистка алтеплазы на сорбенте EMD Chelate Fractogel (Millipore). А – типичный вид хроматограммы (1 – пропуск, 2 – промывка 0,1 М имидазолом, 3 – целевая фракция, 4 – регенерация растворами 0,2 М ЭДТА и 0,5 М NaOH); Б – электрофореграмма фракций (1 – КЖ, 2 – пропуск, 3 – промывка, 4 – целевая фракция).

Применение цинк-хелатной и аффинной хроматографии не снижало содержание ДНК в достаточной степени (Таблица 9), и полупродукт после

перечисленных стадий очистки содержал количество ДНК, превышающее установленную норму (Таблица 7). Для удаления остаточной ДНК продуцента была разработана дополнительная стадия очистки, на основе распространенной, недорогой и обладающей высокой емкостью Q-сефарозы (Cytiva, США). Проведение хроматографии в режиме проскока при рН 7,2 позволило снизить содержание ДНК в препарате на порядок и достичь определенного для разработки уровня.

Таблица 9. Динамика выхода активного белка и удаления примесей в процессе очистки алтеплазы.

Стадия	Выход белка, млн МЕ/л КЖ	Содержание мономера алтеплазы, ГФ-ВЭЖХ	Содержание белков СНО, нг/мг алтеплазы	Содержание ДНК, пг/мг алтеплазы
КЖ	43	85-90%	1000-1500	80-120
Металлохелатная хроматография	41	91-95%	300-600	50-70
Аффинная хроматография	37	96-98%	6-10	50-70
Катионообменная хроматография	34	96-98%	6-10	50-70
Анионообменная хроматография	32	96-98%	6-10	5-10

Перевод алтеплазы в буфер ГЛФ проводили на катионообменном сорбенте Eshmuno S (Millipore, США). Сорбция проводилась при рН 4,0 в буфере, содержащем 1 М мочевины. После нанесения образца колонну промывали стартовым буфером, затем раствором состава 50 мМ аргинин, рН 6,0 для вытеснения мочевины. Целевой белок элюировали с колонны раствором состава 450мМ аргинин, рН 7,3, близким по составу к буферу ГЛФ. В элюате приводили содержание аргинина к 400 мМ путем разбавления водой, и значения рН до $7,3 \pm 0,05$ ед путем титрования раствором гидроксида натрия или фосфорной кислоты.

рН и проводимость элюата Eshmuno S позволили провести фильтрацию через Q-сефарозу без предварительной подготовки образца.

Для обеспечения противовирусной безопасности процесса были добавлены стадии вирусной инактивации при пониженном рН после стадии CaptureSelect tPA (эффективна против оболочечных вирусов) и нанофильтрации субстанции алтеплазы в буфере ГЛФ. Для инактивации вирусов при пониженном рН приводили рН элюата со стадии аффинной хроматографии к 3,5 добавлением 0,5 М уксусной кислоты и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа.

Вирусную фильтрацию осуществляли на тупиковых нанофильтрах Planova 20N с предфильтрами Millex 0,22 мкм, показатели средней скорости потока и объемной производительности аналогичны таковым для тенекеплазы.

Таким образом, была создана технология очистки алтеплазы, состоящая из шести стадий: цинк-хелатная хроматография на EMD Chelate Fractogel, аффинная хроматография на CaptureSelect tPA, инактивация вирусов в элюате CaptureSelect tPA при пониженном рН, перевод в буфер ГЛФ на катионообменном сорбенте Eshmuno S, анионообменная фильтрация на Q-сефарозе и нанофильтрация. Динамика выхода активного белка и удаления примесей в процессе очистки тенекеплазы приведена в таблице 9 и на рисунке 17. Видимые на электрофореграмме примеси удаляются уже на стадии металлохелатной хроматографии, и на последующих стадиях очистки детектируются только методом ИФА.

2.2.5.5. Масштабирование методики очистки алтеплазы

Масштабирование методики очистки было проведено на материале, полученном при культивировании штамма-продуцента ТАП в режиме перфузии в 100 л биореакторе с системой перфузии ATF6, с кратностью перфузии 1 объем реактора в сутки. Масштабирование хроматографических стадий осуществлялось с сохранением высот столбов сорбентов, линейных скоростей потоков и нагрузок на сорбенты. Выход продукта с использованием разработанной методики составил 58 мг/л КЖ. Средний выход процесса очистки по отношению к начальному

содержанию в КЖ составил 75%. Сравнение полученного лекарственного препарата с референтным препаратом приведено в таблице 10.

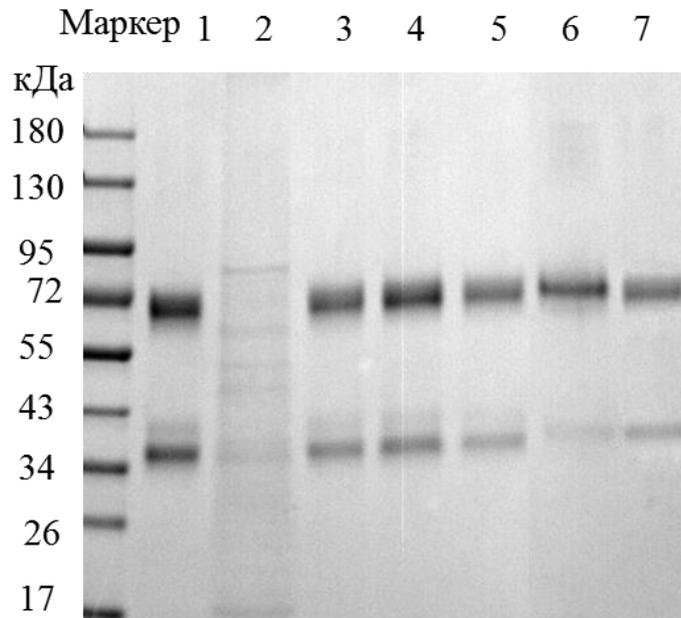


Рисунок 17. Электрофореграмма образцов алтеплазы, полученных в ходе очистки: 1 – КЖ, 2 – металлохелатная хроматография, проскок, 3 – металлохелатная хроматография, целевая фракция, 4 – аффинная хроматография, 5 – катионообменная хроматография, 6 – лекарственная субстанция алтеплазы, 7 – оригинальный препарат Актилизе (Берингер Ингельхайм).

Таблица 10. Сравнение критических показателей качества алтеплазы производства АО «Генериум» и референтного препарата.

Параметр качества, требования Европейской Фармакопеи 9,0	Актилизе (Boehringer Ingelheim)	Алтеплаза (АО «Генериум»)
Содержание мономера, не менее 95%	96,5±1,2	97,1±1,1
Содержание одноцепочечной формы, не менее 60%	81,9±10,3	78,3±8,0
Активность, 460-670 тыс МЕ/мг	565 ±80	560±75
Содержание белков СНО, не более 20 нг/мг	6±2,5	8±4,1

Результаты сравнения полученного препарата алтеплазы с референтным и с требованиями Европейской Фармакопеи 9,0 показывают, что полученный препарат не уступает референтному по критическим параметрам качества и соответствует требованиям Европейской Фармакопеи.

2.2.6. Разработка технологии получения препарата тенектеплазы

2.2.6.1. Отбор клонов-продуцентов тенектеплазы

Первоначально отбор клонов-продуцентов тенектеплазы производился по продуктивности. При этом было обнаружено, что белок, производимый лидерными клонами, обладает сниженной фибринолитической активностью и повышенным сиалированием по сравнению с оригинальным препаратом. Результаты оценки активности вариантов сиалирования тенектеплазы, приведенные в настоящей работе, как и литературные данные [7], [142], свидетельствуют о том, что показатели степени сиалирования и биологической активности для тенектеплазы являются связанными.

На первом этапе исследований продуцентов тенектеплазы была предпринята попытка снизить содержание сиаловых кислот в гликанах тенектеплазы при помощи культуральных методов. По литературным данным, снижение степени сиалирования продукта во время культивирования в биореакторе вызывает повышенная концентрация аммония [143], стресс, вызванный сниженной концентрацией кислорода [144] и другие параметры, снижающие жизнеспособность культуры [145] и приводящие к выходу сиалидаз из цитоплазмы клеток в культуральную жидкость. Состав подпиток, добавление ДМСО и культивирование при пониженной температуре также могут оказать влияние на структуру гликоцепей.

В качестве первого шага была протестирована панель подпиток производителей HyClone и Irvine Scientific. Скрининг показал, что ни одна из подпиток не оказывает существенного влияния на содержание сиаловых кислот и

активность тенекеплазы. Однако подпитка Feed 2 (Irvine Scientific) позволяла культуре достигать высокой продуктивности и была использована при культивировании клона-продуцента тенекеплазы в дальнейшем (Таблица 11).

Таблица 11 – Влияние подпиток и жизнеспособности культуры на сиалирование и активность тенекеплазы.

№	Подпитка	Жизнеспособность, %	Продуктивность, мг/л КЖ	NANA, моль/моль	Активность тенекеплазы, млн МЕ/мг
1	Cell Boost 5 (HyClone), Образец отобран на 6 сутки культивирования	92	341	5,1	0,46
2	Cell Boost 5 (HyClone) Образец отобран на 6 сутки культивирования	81	562	4,2	0,53
3	Feed 2 (Irvine Scientific)	91	600	5,1	0,46
4	Feed 4 (Irvine Scientific)	90	531	4,1	0,47

В процессе подбора подпиток было замечено, что в пробах, отобранных при сниженной жизнеспособности культуры, наблюдается некоторое повышение активности тенекеплазы (Таблица 11, образцы 2 и 4). В то же время, падение жизнеспособности культуры ниже 80% ведет к снижению других критических показателей качества препарата: содержания ОЦ формы, остаточных белков и ДНК продуцента. Вероятно, это связано с частичным лизисом клеток и загрязнением культуральной жидкости клеточным дебрисом. Выход в культуральную жидкость

цитоплазматических протеаз провоцирует процессинг тенекеплазы и превращение одноцепочечной формы в двуцепочечную.

Влияние на степень сиалирования тенекеплазы сниженной температуры культивирования, добавления ионов аммония и ДМСО было исследовано в серии мелкомасштабных культивирований. Повышение активности тенекеплазы на 17% одновременно с падением степени сиалирования на 30% наблюдалось при добавлении 5-20 мМ хлорида аммония в начале продукционной фазы культивирования, снижающих экспрессию генов сиалил-трансфераз, [143], однако активность тенекеплазы в данной серии экспериментов не достигла целевого диапазона (Таблица 12).

Получить продуцент высокоактивной тенекеплазы с сиалированием в рамках определенного для разработки диапазона (3-4 моль NANA / моль) удалось при повторной трансфекции и отборе продуцентов по фибринолитической активности продукта, определявшейся при помощи кинетической хромогенной тест-системы Human tPA Chromogenic AssaySense Activity Assay Kit (Assay Pro).

2.2.6.2. Разработка аналитической методики очистки тенекеплазы

Для проведения аналитических испытаний получаемых в ходе культивирования препаратов ТАП требовался способ быстрой очистки ТАП от компонентов среды и перевода белка в буфер готовой лекарственной формы. Такая аналитическая методика очистки ТАП позволяет быстро и эффективно оценивать продуктивность КЖ и получать очищенный продукт в буфере ГЛФ, пригодный для дальнейших аналитических испытаний.

Таблица 12 – Влияние сниженной температуры, добавления ионов аммония и ДМСО культуры на сиалирование и активность тенектеплазы.

Особенности процесса	Продуктивность мг/л	Сиалирование моль NANA/ моль	Активность, млн МЕ/мг
Контрольный	350	4,92	0,45
Снижение температуры в продукционной фазе с 32°C до 30°C	385	4,5	0,43
5 mM NH ₄ Cl в продукционной фазе	446	4,1	0,51
20 mM NH ₄ Cl в продукционной фазе	302	3,5	0,52
5 mM NH ₄ Cl с начала культивирования	349	3,8	0,49
20 mM NH ₄ Cl с начала культивирования	246	4,3	0,5
1% DMSO в продукционной фазе	387	4,4	0,47
3% DMSO в продукционной фазе	411	4,6	0,47

Для тенектеплазы, основываясь на литературных данных [126, 127, 146-148], в качестве стадии захвата из КЖ опробованы следующие сорбенты: иммобилизованный лизин, сульфопропил-сефароза, гидрофобные сорбенты с фенильной и бутильной функциональными группами (Рисунок 18).

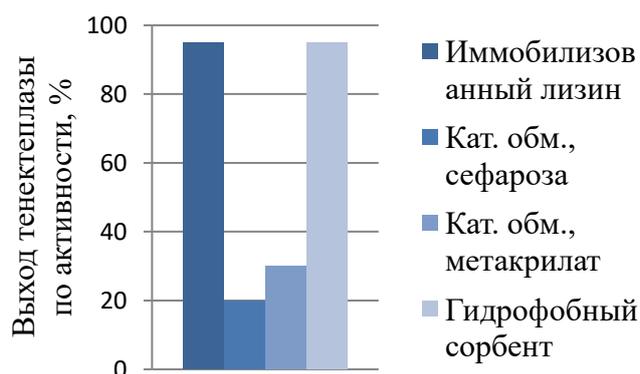


Рисунок 18. Сравнение сорбентов, протестированных для стадии захвата тенектеплазы.

Как правило, для проведения быстрой аналитической очистки используются аффинные и псевдоаффинные сорбенты, для тенектеплазы таковым является лизин-сефароза. Показано, что возможен прямой захват целевого белка из КЖ на лизин-сефарозе. Однако, при использовании аффинного сорбента с иммобилизованным лизином в качестве первой стадии очистки, помимо сорбции тенектеплазы, наблюдалось также большое количество неспецифических взаимодействий сорбента с компонентами КЖ. Это приводило к загрязнению целевой фракции пигментами, затруднению спектрофотометрического определения количества белка в целевой фракции и сокращению срока службы сорбента. При использовании гидрофобной хроматографии неспецифических взаимодействий наблюдалось значительно меньше, поэтому она была выбрана в качестве стадии захвата для аналитической методики, и затем для разработки промышленной методики очистки тенектеплазы.

Эксперименты по сорбции тенектеплазы на гидрофобных сорбентах показали, что в присутствии 0,5 М NaCl целевой белок сорбируется на колонку, а большая часть примесей, в том числе пигмент, остаются в несорбируемой фракции. При элюции градиентом изопропанола фракция, содержащая тенектеплазу, не окрашена, что позволяет оценить количество целевого белка. В связи с более высоким выходом целевого белка выбран гидрофобный сорбент с фенильной группой.

Для второй стадии очистки и перевода препарата тенекеплазы в буфер ГЛФ использовали соль-толерантный анионообменный сорбент, связывающий целевой белок при проводимости исходного образца до 15 мСм/см, что позволяло наносить элюат со стадии гидрофобной хроматографии без разбавления.

Таким образом, для тенекеплазы была разработана аналитическая методика, включающая захват целевого белка из КЖ на гидрофобном сорбенте с фенильной функциональной группой на первой стадии и перевод в буфер готовой лекарственной формы на соль-толерантном анионообменном сорбенте на второй стадии.

С использованием разработанной аналитической методики очистки тенекеплазы были скринированы условия культивирования и выбран стабильный и продуктивный клон, производящий целевой белок с требуемой специфической активностью.

2.2.6.3. Разработка периодического метода культивирования тенекеплазы

Клон-продуцент тенекеплазы адаптировали к бессывороточной среде BalanCD CHO Growth A. После перехода к суспензионному культивированию в периодическом режиме с внесением питательных добавок (режиму фэд-батча) подобрали питательную добавку Feed 2 (Irvine Scientific, подробнее процесс описан в п. 2.2.5.1).

Одновременно было показано, что доля однопочечной формы тенекеплазы падает, а двупочечной, соответственно, возрастает с ходом времени культивирования параллельно с падением жизнеспособности клеток (Рисунок 19). Для получения продукта с долей ОЦ формы более 60% жизнеспособность культуры не должна опускаться ниже 90%, оптимальная продолжительность культивирования при этом составляет 8 суток. Вероятно, причина повышения содержания ОЦ формы кроется в выходе протеаз из лизированных клеток.

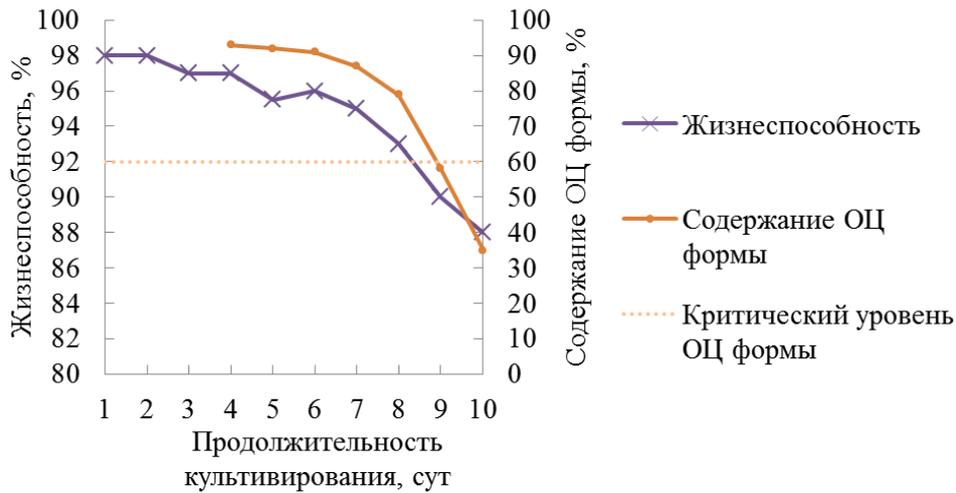


Рисунок 19. Динамика жизнеспособности клеток и содержания О₂ формы в процессе культивирования продуцента тенектеплазы в режиме фед-батч.

2.2.6.4. Масштабирование периодического метода культивирования тенектеплазы

Методика периодического культивирования продуцента тенектеплазы с внесением питательных добавок была апробирована в лабораторном реакторе с осевым перемешиванием объемом 2 литра. В масштабированном процессе культивирования продуктивность и критические показатели качества продукта были сравнимы с процессом культивирования в колбах.

Затем методика масштабирована до пилотного биореактора объемом 100 л. Было обнаружено, что, несмотря на совпадение показателей клеточной плотности и жизнеспособности, продуктивность в 100 л реакторе снизилась с 0,5 до 0,3 г/л. Предположено, что падение продуктивности является результатом травмирующего воздействия пузырьков микробарботера на клетки. Для проверки этой гипотезы на демасштабированной до 2 л модели реактора проведено сравнение процессов культивирования без микробарботера, с микробарботером, а также с использованием микробарботера и добавлением полксамера в качестве протектора (Рисунок 20).

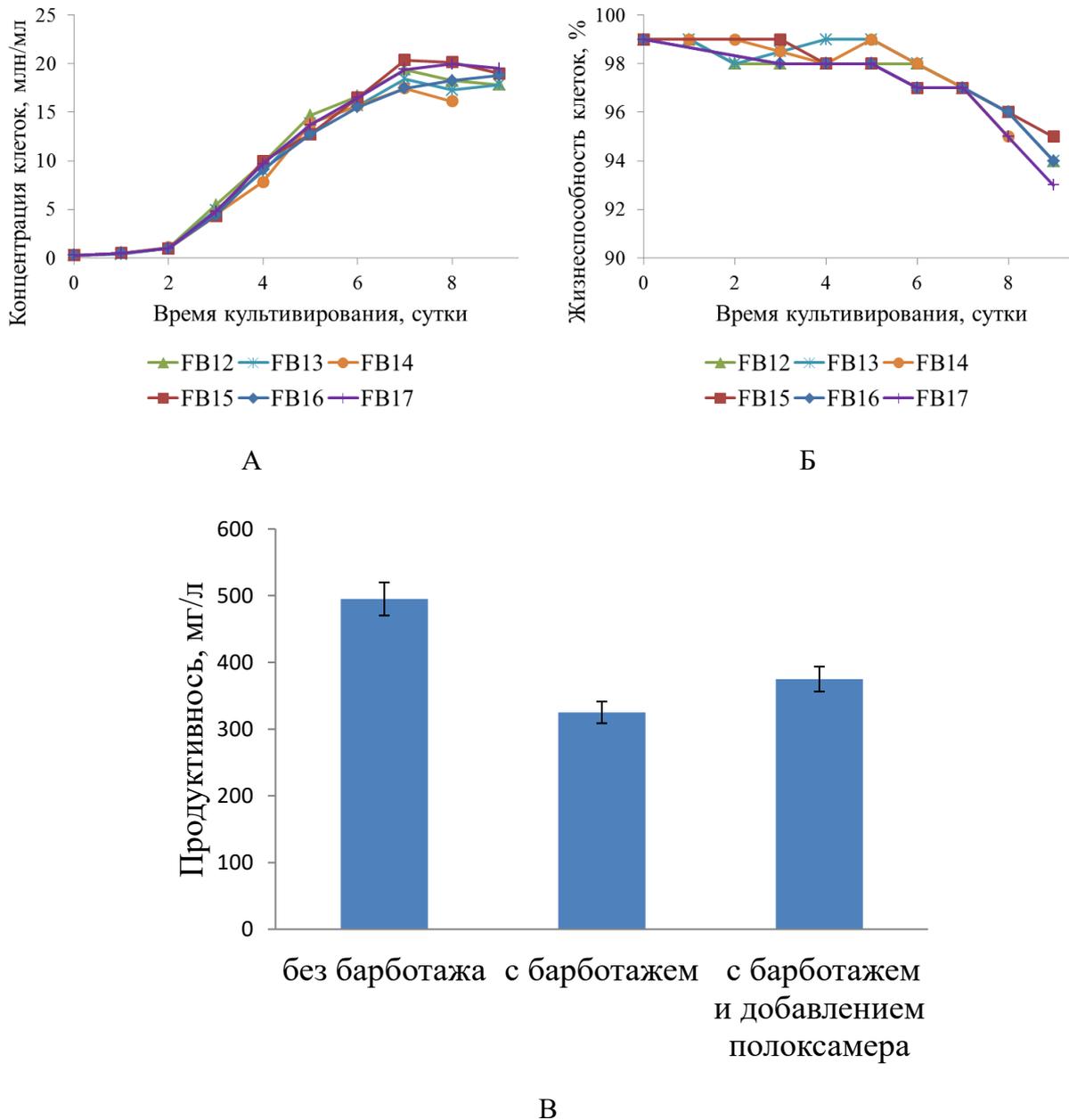


Рисунок 20. Культивирование продуцента тенектеплазы в демасштабированной модели столитрового биореактора.

Динамика клеточной плотности (А), жизнеспособности (Б) и продуктивность (В) в процессах без барботажа (FB12, FB15), с барботажем (FB13, FB16), с барботажем и добавлением полоксамера (FB14, 17).

Ростовые характеристики всех трех процессов были сравнимы, а продуктивность составила около 0,5 г/л в процессе без барботажа, 0,3 г/л в процессе с барботажем и около 0,4 г/л в процессе с микробарботажем и плуроником, что подтвердило гипотезу о негативном влиянии микропузырьков на продукцию

тенектеплазы, которое возможно частично нивелировать добавлением полоксамера в качестве протектора.

2.2.6.5. Разработка метода очистки тенекеплазы

Тенекеплаза склонна к олигомеризации и преципитации в водных растворах. Для стабилизации тенекеплазы в растворы, используемые в ходе очистки препарата, добавляли мочевины в концентрации 1-2 М или аргинин в концентрации 0,2-0,4 М.

В основу промышленной технологии очистки тенекеплазы была положена аналитическая методика очистки (п. 2.2.5.2) При разработке промышленной технологии очистки тенекеплазы к стадии захвата были добавлены стадии, обеспечивающие эффективное удаление примесных белков и ДНК, а также стадии, направленные на удаление и инактивацию вирусов. В качестве основной стадии очистки от примесных белков наиболее эффективна аффинная хроматография. Для тенекеплазы был протестирован ряд аффинных сорбентов; иммобилизованный лизин выбран, как обладающий наибольшей емкостью по отношению к тенекеплазе (Рисунок 21) и позволяющий снизить количество примесных белков в препарате тенекеплазы в 70 раз (Таблица 13).

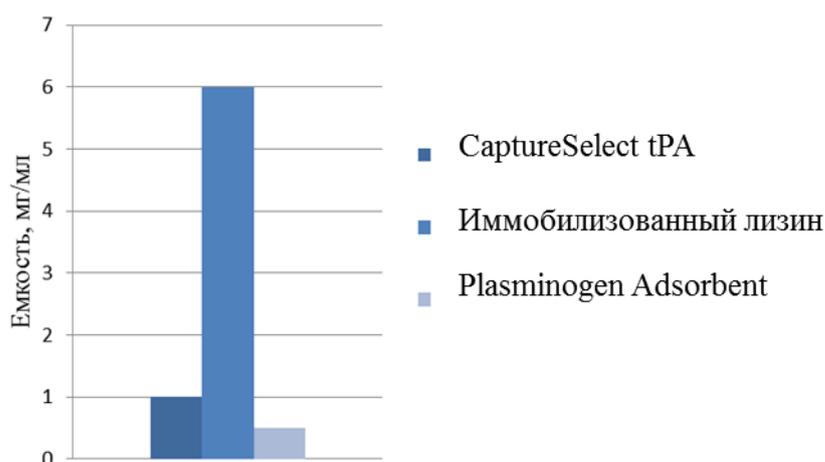


Рисунок 21. Сравнение емкости аффинных сорбентов, использованных для очистки тенекеплазы.

Дополнительную очистку от белков клеток СНО проводили при помощи ионообменной хроматографии. В качестве катионообменного сорбента первоначально использовали сульфопропил-сефарозу, однако при скринировании панели хроматографических сорбентов, имеющих катионообменные свойства, было обнаружено, что сорбция тенектеплазы на мультимодальном сорбенте с катионообменными и гидрофобными свойствами возможна в значительно более широком диапазоне рН (до рН 8,0). Данный эффект обусловлен присутствием гидрофобных групп в составе лиганда и позволяет повысить селективность данной стадии очистки и удалить в три раза больше примесных белков по сравнению с хроматографией на обычном катионообменном сорбенте.

Для удаления эндотоксинов, вирусов, отрицательно заряженных белков СНО и остаточной ДНК распространенной практикой является фильтрация через сильный анионообменный сорбент. Введение анионообменной хроматографии на Q-сефарозе (Cytiva) в режиме проскока позволило дополнительно снизить содержание примесных белков в 2 раза и на порядок снизить содержание примесной ДНК (Таблица 13).

Для перевода очищенного полупродукта в буфер ГЛФ использовали соль-толерантный анионообменный сорбент, позволяющий дополнительно повысить содержание мономера тенектеплазы. При элюции градиентом аргинина олигомеры элюировались с колонки позднее целевой фракции, что позволяло их отделить (Рисунок 22).

Для обеспечения противовирусной безопасности процесса были добавлены стадии вирусной инактивации и нанофильтрации. Инактивация вирусов сольвент-детергентным методом эффективна против оболочечных вирусов; нанофильтрация через фильтр с размером пор 20 нм удаляет вирусные частицы механически.

Таблица 13. Динамика выхода активного белка и удаления примесей в процессе очистки тенектеплазы.

Стадия	Выход белка, млн МЕ/л КЖ	Содержание мономера тенектеплазы, %, ГФ-ВЭЖХ	Содержание белков СНО, нг/мг тенектеплазы	Содержание ДНК, пг/мг тенектеплазы
КЖ	300-350	70-90%	20000–30000	400-600
Гидрофобная хроматография	260-290	70-90%	5000–7000	400-600
Аффинная хроматография	223-246	91-95%	400–500	180-220
Q-фильтрация	200-220	91-95%	240–350	20-35
Мультимодальная катионообменная хроматография	185-205	92-96%	40–65	20-35
Анионообменная хроматография	146-180	97-98%	40–65	3-10

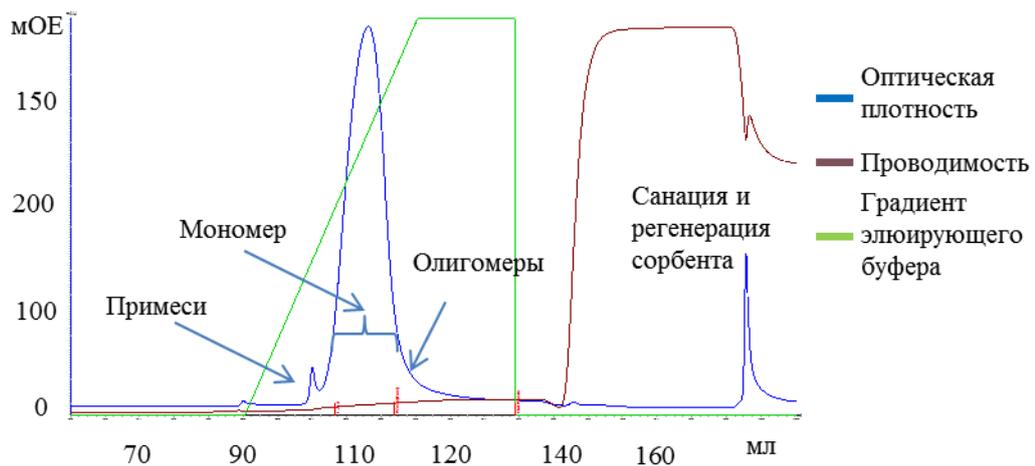


Рисунок 22. Хроматограмма при очистке тенектеплазы на соль-толерантном анионообменном сорбенте.

Инактивацию вирусов в препарате тенекеплазы проводили сольвент-детергентным методом. К полупродукту после первой стадии очистки добавляли полисорбат 80 и TNBP до концентрации 1% и 0,3% соответственно и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа.

Вирусная фильтрация осуществлялась на тупиковых нанофильтрах с предфильтрами. По показателям производительности и стабильности скорости потока для тенекеплазы выбрана комбинация предфильтра Millex 0,22 мкм и нанофильтра Planova 20N. Средняя скорость потока при такой комбинации составила 46 л/м²*ч, объемная производительность—114,5 л/м². При масштабировании фильтрации на фильтре Planova 20N 0,01м² скорость потока и объемная производительность сохранялись.

Таким образом, была создана технология очистки тенекеплазы, состоящая из пяти хроматографических стадий: захват из КЖ и концентрирование на гидрофобном сорбенте, вирусная инактивация, очистка от олигомерных форм и примесных белков клон-продуцента на аффинном сорбенте, Q-фильтрация для удаления ДНК продуцента и возможных вирусов, доочистка на мультимодальном катионообменном сорбенте, концентрирование и перевод в буфер ГЛФ на соль-толерантном анионообменном сорбенте и нанофильтрация. Динамика выхода активного белка и удаления примесей в процессе очистки тенекеплазы приведена в таблице 13 и на рисунке 23. Видимые на электрофореграмме примеси удаляются уже на стадии аффинной хроматографии, и на последующих стадиях очистки детектируются только методом ИФА.

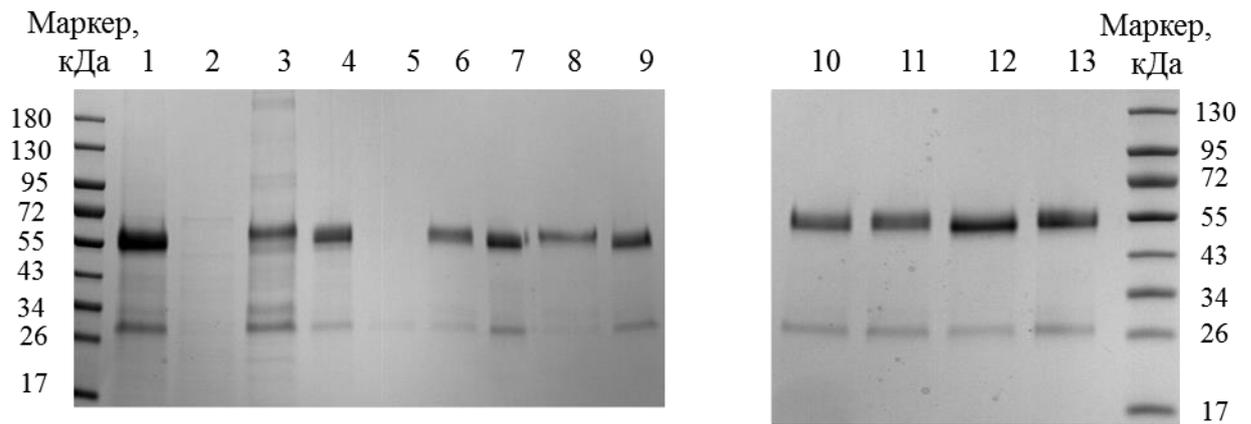


Рисунок 23. Электрофореграмма образцов тенектеплазы, полученных в ходе очистки: 1 – культуральная жидкость, 2 – гидрофобная хроматография, проскок, 3 – гидрофобная хроматография, промывка, 4 – гидрофобная хроматография, элюат, 5 – аффинная хроматография, проскок, 6 – аффинная хроматография, элюат, 7 – Q-фльтрация, фильтрат, 8 – мультимодальная хроматография, элюат, 9 – соль-толерантная анионообменная хроматография, элюат, 10 – готовая субстанция тенектеплазы, 11-13 – Метализе (оригинальный препарат, три различных серии). Полоса около 55 кДа соответствует ОЦ форме тенектеплазы, полоса около 26 кДа – ДЦ форме.

2.2.6.6. Масштабирование методики очистки тенектеплазы

Методика была масштабирована на материале, полученном из 100 л реактора, с сохранением высот столбов сорбентов, линейных скоростей потоков и нагрузок на сорбенты. Получено 15 г очищенного препарата тенектеплазы. Выход белка после всех стадий очистки составил 153 мг (51%) из 1 л КЖ, что близко к значениям, полученным при очистке тенектеплазы в лабораторном масштабе. Сравнение полученного препарата с референтным показало их сопоставимость по критическим параметрам качества (Таблица 14).

Таблица 14. Сравнение критических показателей качества тенектеплазы производства АО «Генериум» и референтного препарата.

Параметр качества, установленный для разработки диапазон	Метализе (Берингер Ингельхайм)	Тенектеплаза (АО Генериум)
Содержание мономера, не менее 95%	97,8±1,6	97,52±1,4
Соотношение одноцепочечной формы, не менее 60%	81,9±9,7	81,3±8,5
Активность, млн МЕ/мг (0,56-0,76)	0,66±0,05	0,69±0,02
Содержание белков СНО, не более 100 нг/мг	70±15	55±12
Содержание сиаловых кислот, мол/мол (2,1-3,9)	3,6±0,5	3,2±0,4

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследований были разработаны технологии культивирования и очистки препаратов алтеплазы и тенектеплазы, позволяющие получать препараты, сопоставимые с референтными препаратами Актилизе и Метализе производства Берингер Ингельхайм. Технологии производства были масштабированы до пилотных объемов.

На основании результатов исследований был создан полный цикл производства субстанций ферментных тромболитических препаратов на территории Российской Федерации, что в перспективе позволит повысить доступность тромболитической терапии для пациентов и снизит зависимость от импорта лекарственных средств.

В настоящий момент препарат алтеплазы, разработанный группой компаний «ГЕНЕРИУМ», зарегистрирован (ЛП-005158), препарат тенектеплазы находится в стадии клинических исследований (РКИ №712 (16.12.2019)).

ВЫВОДЫ

1. Для продуцента алтеплазы разработан способ непрерывного суспензионного культивирования при скорости потока питательной среды 1 объем реактора/сутки, позволяющий получать препарат алтеплазы с содержанием одноцепочечной формы не менее 60%.

2. Для продуцента тенектеплазы разработан способ периодического суспензионного культивирования длительностью 8 суток, позволяющий получать препарат тенектеплазы с содержанием одноцепочечной формы не менее 60%.

3. Создана технология очистки алтеплазы, состоящая из четырех хроматографических стадий: цинк-хелатная хроматография на EMD Chelate Fractogel, аффинная хроматография на CaptureSelect tPA, перевод в буфер ГЛФ на катионообменном сорбенте Eshmuno S, анионообменная фильтрация на Q-сефарозе – позволяющая получать препарат алтеплазы с содержанием мономера более 96%, содержанием примесных белков менее 12,1 нг/мл, примесной ДНК – менее 10 пг/мг. Выход алтеплазы составляет 75%.

4. Создана технология очистки тенектеплазы, состоящая из пяти хроматографических стадий: захват из культуральной жидкости и концентрирование на гидрофобном сорбенте, очистка от олигомерных форм и примесных белков клона-продуцента на иммобилизованном лизине, анионообменная фильтрация для удаления ДНК продуцента, хроматография на мультимодальном катионообменном сорбенте, концентрирование и перевод в буфер готовой лекарственной формы на соль-толерантном анионообменном сорбенте, позволяющая получать препарат тенектеплазы с содержанием мономера более 96%, содержанием примесных белков менее 67 нг/мг, примесной ДНК – менее 10 пг/мг. Выход тенектеплазы составляет 45-50%.

5. Проведено масштабирование процессов культивирования и очистки алтеплазы до биореактора объемом 100 л. Показано, что производственный

процесс позволяет получить за 15 суток непрерывного процесса культивирования около около 78 г очищенной алтеплазы (1560 доз).

6. Проведено масштабирование процессов культивирования и очистки тенектеплазы до биореактора объемом 100 л. Показано, что производственный процесс позволяет получить за 8 суток периодического процесса культивирования около 15 г тенектеплазы (300 доз).

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

Препарат Ревелиза (алтеплаза, АО «Генериум») является первым отечественным препаратом ТАП, производимым по полному циклу, биоаналогом препарата Актилизе (Берингер). Рекомендуемая область для применения – в составе комплексной терапии ишемических инсультов, инфарктов, ТЭЛА человека.

Препарат Тенектеплаза (тенектеплаза, АО «Генериум») является первым отечественным биоаналогом препарата Метализе (Берингер), производимым по полному циклу. Рекомендуемая область для применения – в составе комплексной терапии инфарктов.

Разработанные подходы оптимизации процессов культивирования и очистки рекомбинантных белков могут быть рекомендованы в качестве базовых подходов при разработке других рекомбинантных белковых препаратов, в том числе характеризующихся высокой нестабильностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gurman P., Miranda O. R., Nathan A., Washington C., Rosen Y., Elman N. M. Recombinant tissue plasminogen activators (rtPA): a review // *Clin Pharmacol Ther.* – 2015. – Т. 97, № 3. – С. 274-85.
2. FDA approves single-injection, bolus-dose thrombolytic agent // *Am J Health Syst Pharm.* – 2000. – Т. 57, № 14. – С. 1297.
3. Zivin J. A. Acute stroke therapy with tissue plasminogen activator (tPA) since it was approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) // *Ann Neurol.* – 2009. – Т. 66, № 1. – С. 6-10.
4. Медведев Д. Приложение № 1 к распоряжению Правительства Российской Федерации от 23 октября 2017 г. № 2323-р "Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2018 год". – 2018. – URL: <http://static.government.ru/media/files/A5dTKAhmBi3JmTIgzD-SOKC7G6VwDShxi.pdf> (дата обращения: 15.12.2020).
5. Bode W., Renatus M. Tissue-type plasminogen activator: variants and crystal/solution structures demarcate structural determinants of function // *Curr Opin Struct Biol.* – 1997. – Т. 7, № 6. – С. 865-72.
6. Parekh R. B., Dwek R. A., Thomas J. R., Opdenakker G., Rademacher T. W., Wittwer A. J., Howard S. C., Nelson R., Siegel N. R., Jennings M. G., et al. Cell-type-specific and site-specific N-glycosylation of type I and type II human tissue plasminogen activator // *Biochemistry.* – 1989. – Т. 28, № 19. – С. 7644-62.
7. Kliche W., Krech I., Michel M. C., Sangole N. V., Sathaye S. Comparison of clot lysis activity and biochemical properties of originator tenecteplase (Metalyse((R))) with those of an alleged biosimilar // *Front Pharmacol.* – 2014. – Т. 5. – С. 7.
8. Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs; Case Historie. Pharmaceutical Biotechnology. / Tue H. Nguyen C. W.; Под ред. Borchardt R. T. – The University of Kansas; Lawrence. Kansas, 1993. Pharmaceutical Biotechnology.

9. Chisti Y. Animal cell culture in stirred bioreactors: Observations on scale-up // *Bioprocess Engineering* – Т. 9, № 5. – С. 191-196.
10. The global burden of disease: 2004 update / World Health Organization. 2008.
11. Основные показатели здоровья населения и здравоохранения Сибирского федерального округа в 2012 году. Сборник статистических и аналитических материалов. / ФГБУЗ СОМЦ ФМБА России: Стрельченко О. В. 2013.
12. Плечев В. В., Бакиров А. А., Плечева Д. В., Юсупов Р. Х., Губайдуллин С. М., Олейник Б. А., Мустафин В. А. Актуальные вопросы профилактики тромбоэмболии легочной артерии // *Медицинский вестник Башкортостана*. – 2013. № 6.
13. Министерство промышленности и торговли. Приказ Минпромторга РФ от 23.10.2009 N 965 "Об утверждении Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года". – 2009. – URL: <http://static.government.ru/media/files/41d4e85f0b854eb1b02d.pdf> (дата обращения: 06.03.2020).
14. Медведев Д. Постановление об утверждении Правил формирования перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи. – 2014. – URL: <http://government.ru/media/files/myBXVUxYbiU.pdf>.
15. Datar R. V., Cartwright T., Rosen C. G. Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator // *Biotechnology (N Y)*. – 1993. – Т. 11, № 3. – С. 349-57.
16. Все аптеки. Сравнение цен интернет-аптек. – 2016. – URL: <http://www.vse-apteki.ru/lekarstva/aktimize.htm>. (дата обращения: 26.02.16.2016).
17. Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture // *Thromb Haemost.* – 1980. – Т. 43, № 2. – С. 77-89.

18. Pennica D., Holmes W. E., Kohr W. J., Harkins R. N., Vehar G. A., Ward C. A., Bennett W. F., Yelverton E., Seeburg P. H., Heyneker H. L., Goeddel D. V., Collen D. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in E. coli // *Nature*. – 1983. – Т. 301, № 5897. – С. 214-21.

19. Collen D., Topol E. J., Tiefenbrunn A. J., Gold H. K., Weisfeldt M. L., Sobel B. E., Leinbach R. C., Brinker J. A., Ludbrook P. A., Yasuda I., et al. Coronary thrombolysis with recombinant human tissue-type plasminogen activator: a prospective, randomized, placebo-controlled trial // *Circulation*. – 1984. – Т. 70, № 6. – С. 1012-7.

20. Walton M. Summary Basis of Approval // *Book Summary Basis of Approval / EditorFDA*, 1987.

21. Van de Werf F. J. The ideal fibrinolytic: can drug design improve clinical results? // *Eur Heart J*. – 1999. – Т. 20, № 20. – С. 1452-8.

22. Collen D., Lijnen H. R. Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account // *J Thromb Haemost*. – 2004. – Т. 2, № 4. – С. 541-6.

23. Rivera-Bou W. L. Thrombolytic Therapy. – 2015. – URL: <http://emedicine.medscape.com/article/811234-overview#a2> (дата обращения: 26.02.16.2016).

24. Matsuo O., Rijken D. C., Collen D. Thrombolysis by human tissue plasminogen activator and urokinase in rabbits with experimental pulmonary embolus // *Nature*. – 1981. – Т. 291, № 5816. – С. 590-1.

25. Bergmann S. R., Fox K. A., Ter-Pogossian M. M., Sobel B. E., Collen D. Clot-selective coronary thrombolysis with tissue-type plasminogen activator // *Science*. – 1983. – Т. 220, № 4602. – С. 1181-3.

26. Van de Werf F., Bergmann S. R., Fox K. A., de Geest H., Hoyng C. F., Sobel B. E., Collen D. Coronary thrombolysis with intravenously administered human tissue-type plasminogen activator produced by recombinant DNA technology // *Circulation*. – 1984. – Т. 69, № 3. – С. 605-10.

27. Van de Werf F., Ludbrook P. A., Bergmann S. R., Tiefenbrunn A. J., Fox K. A., de Geest H., Verstraete M., Collen D., Sobel B. E. Coronary thrombolysis with tissue-

type plasminogen activator in patients with evolving myocardial infarction // *N Engl J Med.* – 1984. – T. 310, № 10. – C. 609-13.

28. de Bono D. P. Thrombolytic therapy of acute myocardial infarction // *Baillieres Clin Haematol.* – 1995. – T. 8, № 2. – C. 403-12.

29. An international randomized trial comparing four thrombolytic strategies for acute myocardial infarction. The GUSTO investigators // *N Engl J Med.* – 1993. – T. 329, № 10. – C. 673-82.

30. The effects of tissue plasminogen activator, streptokinase, or both on coronary-artery patency, ventricular function, and survival after acute myocardial infarction. The GUSTO Angiographic Investigators // *N Engl J Med.* – 1993. – T. 329, № 22. – C. 1615-22.

31. Neumar R. W., Shuster M., Callaway C. W., Gent L. M., Atkins D. L., Bhanji F., Brooks S. C., de Caen A. R., Donnino M. W., Ferrer J. M., Kleinman M. E., Kronick S. L., Lavonas E. J., Link M. S., Mancini M. E., Morrison L. J., O'Connor R. E., Samson R. A., Schexnayder S. M., Singletary E. M., Sinz E. H., Travers A. H., Wyckoff M. H., Hazinski M. F. Part 1: Executive Summary: 2015 American Heart Association Guidelines Update for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care // *Circulation.* – 2015. – T. 132, № 18 Suppl 2. – C. S315-67.

32. Melandri G., Vagnarelli F., Calabrese D., Semprini F., Nanni S., Branzi A. Review of tenecteplase (TNKase) in the treatment of acute myocardial infarction // *Vasc Health Risk Manag.* – 2009. – T. 5, № 1. – C. 249-56.

33. Reed G. W., Rossi J. E., Cannon C. P. Acute myocardial infarction // *The Lancet.* – 2017. – T. 389, № 10065. – C. 197-210.

34. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group // *N Engl J Med.* – 1995. – T. 333, № 24. – C. 1581-7.

35. Wardlaw J. M., Murray V., Berge E., del Zoppo G., Sandercock P., Lindley R. L., Cohen G. Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an

updated systematic review and meta-analysis // *Lancet*. – 2012. – T. 379, № 9834. – C. 2364-72.

36. DeMers G., Meurer W. J., Shih R., Rosenbaum S., Vilke G. M. Tissue plasminogen activator and stroke: review of the literature for the clinician // *J Emerg Med*. – 2012. – T. 43, № 6. – C. 1149-54.

37. Powers W. J., Derdeyn C. P., Biller J., Coffey C. S., Hoh B. L., Jauch E. C., Johnston K. C., Johnston S. C., Khalessi A. A., Kidwell C. S., Meschia J. F., Ovbiagele B., Yavagal D. R. 2015 American Heart Association/American Stroke Association Focused Update of the 2013 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke Regarding Endovascular Treatment: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association // *Stroke*. – 2015. – T. 46, № 10. – C. 3020-35.

38. David Newman M. Thrombolytics for Acute Ischemic Stroke: No benefit found. – 2013. – URL: <http://www.thent.com/nnt/thrombolytics-for-stroke/>.

39. Campbell B. C., Meretoja A., Donnan G. A., Davis S. M. Twenty-Year History of the Evolution of Stroke Thrombolysis With Intravenous Alteplase to Reduce Long-Term Disability // *Stroke*. – 2015. – T. 46, № 8. – C. 2341-6.

40. Kheiri B., Osman M., Abdalla A., Haykal T., Ahmed S., Hassan M., Bachuwa G., Al Qasbi M., Bhatt D. L. Tenecteplase versus alteplase for management of acute ischemic stroke: a pairwise and network meta-analysis of randomized clinical trials // *J Thromb Thrombolysis*. – 2018. – T. 46, № 4. – C. 440-450.

41. Bivard A., Huang X., Levi C. R., Spratt N., Campbell B. C. V., Cheripelli B. K., Kalladka D., Moreton F. C., Ford I., Bladin C. F., Davis S. M., Donnan G. A., Muir K. W., Parsons M. W. Tenecteplase in ischemic stroke offers improved recanalization: Analysis of 2 trials // *Neurology*. – 2017. – T. 89, № 1. – C. 62-67.

42. Logallo N., Novotny V., Assmus J., Kvistad C. E., Alteheld L., Ronning O. M., Thommessen B., Amthor K. F., Ihle-Hansen H., Kurz M., Tobro H., Kaur K., Stankiewicz M., Carlsson M., Morsund A., Idicula T., Aamodt A. H., Lund C., Naess H., Waje-

Andreassen U., Thomassen L. Tenecteplase versus alteplase for management of acute ischaemic stroke (NOR-TEST): a phase 3, randomised, open-label, blinded endpoint trial // *Lancet Neurol.* – 2017. – T. 16, № 10. – C. 781-788.

43. Tapson V. F. Thrombolytic therapy for acute pulmonary embolism // *Semin Thromb Hemost.* – 2013. – T. 39, № 4. – C. 452-8.

44. Meyer G., Vicaut E., Danays T., Agnelli G., Becattini C., Beyer-Westendorf J., Bluhmki E., Bouvaist H., Brenner B., Couturaud F., Dellas C., Empen K., Franca A., Galie N., Geibel A., Goldhaber S. Z., Jimenez D., Kozak M., Kupatt C., Kucher N., Lang I. M., Lankeit M., Meneveau N., Pacouret G., Palazzini M., Petris A., Pruszczyk P., Rugolotto M., Salvi A., Schellong S., Sebbane M., Sobkowicz B., Stefanovic B. S., Thiele H., Torbicki A., Verschuren F., Konstantinides S. V. Fibrinolysis for patients with intermediate-risk pulmonary embolism // *N Engl J Med.* – 2014. – T. 370, № 15. – C. 1402-11.

45. Smithburger P. L., Campbell S., Kane-Gill S. L. Alteplase treatment of acute pulmonary embolism in the intensive care unit // *Crit Care Nurse.* – 2013. – T. 33, № 2. – C. 17-27.

46. Lawn R. M., Adelman J., Bock S. C., Franke A. E., Houck C. M., Najarian R. C., Seeburg P. H., Wion K. L. The sequence of human serum albumin cDNA and its expression in *E. coli* // *Nucleic Acids Res.* – 1981. – T. 9, № 22. – C. 6103-114.

47. van Zonneveld A. J., Veerman H., Pannekoek H. Autonomous functions of structural domains on human tissue-type plasminogen activator // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1986. – T. 83, № 13. – C. 4670-4.

48. Jornvall H., Pohl G., Bergsdorf N., Wallen P. Differential proteolysis and evidence for a residue exchange in tissue plasminogen activator suggest possible association between two types of protein microheterogeneity // *FEBS Lett.* – 1983. – T. 156, № 1. – C. 47-50.

49. Browne M. J., Carey J. E., Chapman C. G., Tyrrell A. W., Entwisle C., Lawrence G. M., Reavy B., Dodd I., Esmail A., Robinson J. H. A tissue-type plasminogen activator

mutant with prolonged clearance in vivo. Effect of removal of the growth factor domain // *J Biol Chem.* – 1988. – T. 263, № 4. – C. 1599-602.

50. Docagne F., Parcq J., Lijnen R., Ali C., Vivien D. Understanding the functions of endogenous and exogenous tissue-type plasminogen activator during stroke // *Stroke.* – 2015. – T. 46, № 1. – C. 314-20.

51. Ny T., Elgh F., Lund B. The structure of the human tissue-type plasminogen activator gene: correlation of intron and exon structures to functional and structural domains // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1984. – T. 81, № 17. – C. 5355-9.

52. Higgins D. L., Vehar G. A. Interaction of one-chain and two-chain tissue plasminogen activator with intact and plasmin-degraded fibrin // *Biochemistry.* – 1987. – T. 26, № 24. – C. 7786-91.

53. Cleary S., Mulkerrin M. G., Kelley R. F. Purification and characterization of tissue plasminogen activator kringle-2 domain expressed in *Escherichia coli* // *Biochemistry.* – 1989. – T. 28, № 4. – C. 1884-91.

54. Lijnen H. R., Collen D. Strategies for the improvement of thrombolytic agents // *Thromb Haemost.* – 1991. – T. 66, № 1. – C. 88-110.

55. Wallen P., Bergsdorf N., Ranby M. Purification and identification of two structural variants of porcine tissue plasminogen activator by affinity adsorption on fibrin // *Biochim Biophys Acta.* – 1982. – T. 719, № 2. – C. 318-28.

56. Rijken D. C., Hoylaerts M., Collen D. Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator // *J Biol Chem.* – 1982. – T. 257, № 6. – C. 2920-5.

57. Rudd P. M., Dwek R. A. Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins // *Crit Rev Biochem Mol Biol.* – 1997. – T. 32, № 1. – C. 1-100.

58. Textbook of Coronary Thrombosis and Thrombolysis. Springer Science & Business Media. / Becker R. C.: Springer, 2008. Springer Science & Business Media.

59. Spellman M. W., Basa L. J., Leonard C. K., Chakel J. A., O'Connor J. V., Wilson S., van Halbeek H. Carbohydrate structures of human tissue plasminogen activator

expressed in Chinese hamster ovary cells // *J Biol Chem.* – 1989. – T. 264, № 24. – C. 14100-11.

60. Little S. P., Bang N. U., Harms C. S., Marks C. A., Mattler L. E. Functional properties of carbohydrate-depleted tissue plasminogen activator // *Biochemistry.* – 1984. – T. 23, № 25. – C. 6191-5.

61. Opdenakker G., Van Damme J., Bosman F., Billiau A., De Somer P. Influence of carbohydrate side chains on activity of tissue-type plasminogen activator // *Proc Soc Exp Biol Med.* – 1986. – T. 182, № 2. – C. 248-57.

62. Smedsrod B., Einarsson M., Pertoft H. Tissue plasminogen activator is endocytosed by mannose and galactose receptors of rat liver cells // *Thromb Haemost.* – 1988. – T. 59, № 3. – C. 480-4.

63. Smalling R. W. Molecular biology of plasminogen activators: what are the clinical implications of drug design? // *Am J Cardiol.* – 1996. – T. 78, № 12a. – C. 2-7.

64. Davydov L., Cheng J. W. Tenecteplase: a review // *Clin Ther.* – 2001. – T. 23, № 7. – C. 982-97; discussion 981.

65. Tanswell P., Modi N., Combs D., Danays T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tenecteplase in fibrinolytic therapy of acute myocardial infarction // *Clin Pharmacokinet.* – 2002. – T. 41, № 15. – C. 1229-45.

66. Schellekens H. Biosimilar therapeutics-what do we need to consider? // *NDT Plus.* – 2009. – T. 2, № Suppl_1. – C. i27-i36.

67. Collen D. J., Rijken D. C., Matsuo O. Plasminogen activator and pharmaceutical composition having thrombolytic activity // *Book Plasminogen activator and pharmaceutical composition having thrombolytic activity / EditorGoogle Patents, 1988.*

68. Dunn J. S., Nayar R., Campos J., Hybertson B. M., Zhou Y., Manning M. C., Repine J. E., Stringer K. A. Feasibility of tissue plasminogen activator formulated for pulmonary delivery // *Pharm Res.* – 2005. – T. 22, № 10. – C. 1700-7.

69. Wilkins M. R., Gasteiger E., Bairoch A., Sanchez J. C., Williams K. L., Appel R. D., Hochstrasser D. F. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server // *Methods Mol Biol.* – 1999. – Т. 112. – С. 531-52.
70. Europe C. o. *European Pharmacopoeia 7.0.* – Strasbourg: Council of Europe, 2009. – С. 1352-1355.
71. Commission Directive 2003/63/EC of 25 June 2001 amending Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use. // *Book Commission Directive 2003/63/EC of 25 June 2001 amending Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use.* / Editor Official Journal of the European Union, L 159, 27.6.2003, p.46., 2003.
72. Медведев Д. Федеральный закон от 12.04.2010 N 61-ФЗ (ред. от 13.07.2020 № 206-ФЗ) "Об обращении лекарственных средств". – 2010. – URL: <https://www.fsvps.gov.ru/fsvps/download/attachment/47569/fz-61.pdf> (дата обращения: 03.03.2020).
73. Information guide for healthcare professionals Biosimilars in the EU. // European Medicines Agency and the European Commission. – 2019.
74. Matej M. Number of biosimilars approved annually by the FDA from 2015 to 2020. – 2020. – URL: <https://www.statista.com/statistics/1186585/number-biosimilar-drugs-approved-each-year-fda-us/> (дата обращения: 01.02.2020).
75. Rijken D. C., Wijngaards G., Zaal-de Jong M., Welbergen J. Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue // *Biochim Biophys Acta.* – 1979. – Т. 580, № 1. – С. 140-53.
76. Collen D., Lijnen H. R. The tissue-type plasminogen activator story // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2009. – Т. 29, № 8. – С. 1151-5.
77. Rijken D. C., Wijngaards G., Welbergen J. Relationship between tissue plasminogen activator and the activators in blood and vascular wall // *Thromb Res.* – 1980. – Т. 18, № 6. – С. 815-30.

78. Wiman B., Andersson T., Hallqvist J., Reuterwall C., Ahlbom A., deFaire U. Plasma levels of tissue plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor-1 complex and von Willebrand factor are significant risk markers for recurrent myocardial infarction in the Stockholm Heart Epidemiology Program (SHEEP) study // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2000. – T. 20, № 8. – C. 2019-23.

79. Rijken D. C., van Hinsbergh V. W., Sens E. H. Quantitation of tissue-type plasminogen activator in human endothelial cell cultures by use of an enzyme immunoassay // *Thromb Res.* – 1984. – T. 33, № 2. – C. 145-53.

80. Kadouri A., Bohak Z. EP 0 420 833 A1 Production of plasminogen activator by cells in culture // *Adv Biotechnol Processes.* – 1985. – T. 5. – C. 275-99.

81. Emeis J. J. Perfused rat hindlegs. A model to study plasminogen activator release // *Thromb Res.* – 1983. – T. 30, № 3. – C. 195-203.

82. Levin E. G. Quantitation and properties of the active and latent plasminogen activator inhibitors in cultures of human endothelial cells // *Blood.* – 1986. – T. 67, № 5. – C. 1309-13.

83. Unkeless J., Dano K., Kellerman G. M., Reich E. Fibrinolysis associated with oncogenic transformation. Partial purification and characterization of the cell factor, a plasminogen activator // *J Biol Chem.* – 1974. – T. 249, № 13. – C. 4295-305.

84. Rijken D. C., Collen D. Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture // *J Biol Chem.* – 1981. – T. 256, № 13. – C. 7035-41.

85. Griffiths J. B., Electricwala A. Production of tissue plasminogen activators from animal cells // *Adv Biochem Eng Biotechnol.* – 1987. – T. 34. – C. 147-66.

86. Griffiths J. B., McEntee I. D., Electricwala A., Atkinson A., Sutton P. M., Naish S., Riley P. A. The production and properties of a tissue plasminogen activator from normal epithelial cells grown in microcarrier culture // *Dev Biol Stand.* – 1985. – T. 60. – C. 439-46.

87. Electricwala A., Atkinson T. Purification and properties of plasminogen activators from epithelial cells // *Eur J Biochem.* – 1985. – T. 147, № 3. – C. 511-6.
88. Griffiths B., Atkinson T., Electricwala A., Latter T., Ling R., McEntee I., Riley P. M., Sutton P. M. Production of a fibrinolytic enzyme from cultures of guinea pig keratocytes grown on microcarriers // *Dev Biol Stand.* – 1983. – T. 55. – C. 31-6.
89. Mattes R. The production of improved tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli* // *Semin Thromb Hemost.* – 2001. – T. 27, № 4. – C. 325-36.
90. Long X., Gou Y., Luo M., Zhang S., Zhang H., Bai L., Wu S., He Q., Chen K., Huang A., Zhou J., Wang D. Soluble expression, purification, and characterization of active recombinant human tissue plasminogen activator by auto-induction in *E. coli* // *BMC Biotechnol.* – 2015. – T. 15. – C. 13.
91. Shafiee F., Moazen F., Rabbani M., Mir Mohammad Sadeghi H. Optimization of the Expression of Reteplase in *Escherichia coli* TOP10 Using Arabinose Promoter // *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* – 2015. – T. 10, № 1. – C. e16676.
92. Goojani H. G., Javaran M. J., Nasiri J., Goojani E. G., Alizadeh H. Expression and large-scale production of human tissue plasminogen activator (t-PA) in transgenic tobacco plants using different signal peptides // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2013. – T. 169, № 6. – C. 1940-51.
93. Asgari M., Javaran M. J., Moieni A., Masoumiasl A., Abdolinasab M. Production of human tissue plasminogen activator (tPA) in *Cucumis sativus* // *Prep Biochem Biotechnol.* – 2014. – T. 44, № 2. – C. 182-92.
94. Upshall A., Kumar A. A., Bailey M. C., Parker M. D., Favreau M. A., Lewison K. P., Joseph M. L., Maraganore J. M., McKnight G. L. Secretion of Active Human Tissue Plasminogen Activator from the Filamentous Fungus *Aspergillus Nidulans* // *Nat Biotech.* – 1987. – T. 5, № 12. – C. 1301-1304.
95. Reddy V. B., Garramone Aj Fau - Sasak H., Sasak H Fau - Wei C. M., Wei Cm Fau - Watkins P., Watkins P Fau - Galli J., Galli J Fau - Hsiung N., Hsiung N. Expression

of human uterine tissue-type plasminogen activator in mouse cells using BPV vectors // № 0198-0238 (Print).

96. Jarvis D. L., Summers M. D. Glycosylation and secretion of human tissue plasminogen activator in recombinant baculovirus-infected insect cells // D - NLM: PMC362163 EDAT- 1989/01/01 MHDA- 1989/01/01 00:01 CRDT- 1989/01/01 00:00 PST - ppublish № 0270-7306 (Print).

97. Ebert K. M., Selgrath Jp Fau - DiTullio P., DiTullio P Fau - Denman J., Denman J Fau - Smith T. E., Smith Te Fau - Memon M. A., Memon Ma Fau - Schindler J. E., Schindler Je Fau - Monastersky G. M., Monastersky Gm Fau - Vitale J. A., Vitale Ja Fau - Gordon K., Gordon K. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression // № 0733-222X (Print).

98. Pittius C. W., Hennighausen L., Lee E., Westphal H., Nicols E., Vitale J., Gordon K. A milk protein gene promoter directs the expression of human tissue plasminogen activator cDNA to the mammary gland in transgenic mice // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1988. – T. 85, № 16. – C. 5874-8.

99. Butler M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals // Appl Microbiol Biotechnol. – 2005. – T. 68, № 3. – C. 283-91.

100. Khan K. - Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications // Adv Pharm Bull. – 2013. – T. 3, № 2. – C. 257-63.

101. Rouf S. A., Moo-Young M., Chisti Y. Tissue-type plasminogen activator: characteristics, applications and production technology // Biotechnol Adv. – 1996. – T. 14, № 3. – C. 239-66.

102. Källström U., Chatzisavido N., Buzsáky F., Lindner-Olsson E. Optimization of tPA production in a 3L Continuous Perfusion Bioreactor // Production of Biologicals from Animal Cells in Culture / Spier R. E. и др. Butterworth-Heinemann, 1991. – C. 745-747.

103. Nilsson K., Birnbaum S., Mosbach K. Microcarrier culture of recombinant Chinese hamster ovary cells for production of human immune interferon and human tissue-type plasminogen activator // *Applied Microbiology and Biotechnology* – T. 27, № 4. – С. 366-371.

104. Legmann R., Benoit B Fau - Fedechko R. W., Fedechko R W Fau - Deppeler C. L., Deppeler C I Fau - Srinivasan S., Srinivasan S Fau - Robins R. H., Robins R H Fau - McCormick E. L., McCormick E I Fau - Ferrick D. A., Ferrick D A Fau - Rodgers S. T., Rodgers S T Fau - Russo A. P., Russo A. P. A strategy for clone selection under different production conditions // № 1520-6033 (Electronic).

105. *European Pharmacopoeia 5.0.* – 5 изд., 2005. – 956-959 с.

106. Kruithof E. K., Schleuning W. D., Bachmann F. Human tissue-type plasminogen activator. Production in continuous serum-free cell culture and rapid purification // *Biochem J.* – 1985. – Т. 226, № 3. – С. 631-6.

107. Royston D. The current place of aprotinin in the management of bleeding // *Anaesthesia.* – 2015. – Т. 70 Suppl 1. – С. 46-9, e17.

108. Collen D., Rijken D. C., Van Damme J., Billiau A. Purification of human tissue-type plasminogen activator in centigram quantities from human melanoma cell culture fluid and its conditioning for use in vivo // *Thromb Haemost.* – 1982. – Т. 48, № 3. – С. 294-6.

109. WallÉN P., Pohl G., Bergsdorf N., RÅNby M., Ny T., JÖRnvall H. Purification and Characterization of a Melanoma Cell Plasminogen Activator // . – 1983.

110. Einarsson M., Brandt J., Kaplan L. Large-scale purification of human tissue-type plasminogen activator using monoclonal antibodies // *Biochim Biophys Acta.* – 1985. – Т. 830, № 1. – С. 1-10.

111. Nielsen L. S., Hansen J. G., Andreasen P. A., Skriver L., Dano K., Zeuthen J. Monoclonal antibody to human 66,000 molecular weight plasminogen activator from melanoma cells. Specific enzyme inhibition and one-step affinity purification // *Embo j.* – 1983. – Т. 2, № 1. – С. 115-9.

112. Heussen C., Joubert F., Dowdle E. B. Purification of human tissue plasminogen activator with Erythrina trypsin inhibitor // *J Biol Chem.* – 1984. – T. 259, № 19. – C. 11635-8.
113. Dodd I., Jalalpour S., Southwick W., Newsome P., Browne M. J., Robinson J. H. Large scale, rapid purification of recombinant tissue-type plasminogen activator // *FEBS Lett.* – 1986. – T. 209, № 1. – C. 13-7.
114. Wang L. F., Hum W. T., Kalyan N. K., Lee S. G., Hung P. P., Doi R. H. Synthesis and refolding of human tissue-type plasminogen activator in *Bacillus subtilis* // *Gene.* – 1989. – T. 84, № 1. – C. 127-33.
115. Sarmientos P., Duchesne M., Deneffe P., Boiziau J., Fromage N., Delporte N., Parker F., Lelievre Y., Mayaux J.-F., Cartwright T. Synthesis and Purification of Active Human Tissue Plasminogen Activator From *Escherichia coli* // *Nat Biotech.* – 1989. – T. 7, № 5. – C. 495-501.
116. Hua Z. C. Renaturation and purification of recombinant tissue-type plasminogen activator expressed in *E. coli* // *Biochem Mol Biol Int.* – 1997. – T. 41, № 4. – C. 815-20.
117. Qiu J., Swartz J. R., Georgiou G. Expression of active human tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli* // *Appl Environ Microbiol.* – 1998. – T. 64, № 12. – C. 4891-6.
118. Edmunds T., Foley S. F. Recovery of tissue plasminogen activator // *Book Recovery of tissue plasminogen activator / EditorGoogle Patents, 1990.*
119. Morii M., Kawashima N., Mori K., Ohoka M. Method for purifying a crude tissue plasminogen activator preparation // *Book Method for purifying a crude tissue plasminogen activator preparation / EditorGoogle Patents, 1992.*
120. Morii M., Ohoka M., Suzuki T., Suzuki K., Kawashima N., Morii N. M. T. A., Mori K. M. T. I. A. A process for the purification of tPA // *Book A process for the purification of tPA / EditorGoogle Patents, 1988.*

121. Patel A., Nishikawa A. H. US5141862A Method of purifying tpa or plasminogen activator using a tripeptide of the formula: -X-Y-argininal wherein X and Y are selected from the group consisting of pro,phe,trp and tyr. – 1992. – URL: <https://www.google.ch/patents/US5141862> (дата обращения: 05.10.2020).

122. Maclennan J. M., Ladner R. C., Ransohoff T. C. Purification of tissue plasminogen activator (tpa) // Book Purification of tissue plasminogen activator (tpa) / Editor-Google Patents, 2010.

123. Refino C. J., Paoni N. F., Keyt B. A., Pater C. S., Badillo J. M., Wurm F. M., Ogez J., Bennett W. F. A variant of t-PA (T103N, KHRR 296-299 AAAA) that, by bolus, has increased potency and decreased systemic activation of plasminogen // Thromb Haemost. – 1993. – Т. 70, № 2. – С. 313-9.

124. Keyt B. A., Paoni N. F., Refino C. J., Berleau L., Nguyen H., Chow A., Lai J., Pena L., Pater C., Ogez J., et al. A faster-acting and more potent form of tissue plasminogen activator // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1994. – Т. 91, № 9. – С. 3670-4.

125. Bennett W. F., Paoni N. F., Keyt B. A., Botstein D., Jones A. J., Presta L., Wurm F. M., Zoller M. J. High resolution analysis of functional determinants on human tissue-type plasminogen activator // J Biol Chem. – 1991. – Т. 266, № 8. – С. 5191-201.

126. Arjun Raghuwanshi S. S. K., Ankit Kumar, Mihir Sahoo Ranjan, Sanjay Singh. US20180223270 A novel purification process for isolation and commercial production of recombinant TNK-TPA Tenecteplase // Book US20180223270 A novel purification process for isolation and commercial production of recombinant TNK-TPA Tenecteplase / Editor. – United States of America, 2018.

127. Patell Viloo Morawala G. S., Maity Sunit, Shekar Sunil, Chitta Geetha, Babu Nabi, Shrinivasan Ragunath. WO2011015922A1 A Highly Efficient Process of Purification And Production of Recombinant TNK-tPA (Tenecteplase). – 2011. – URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/f8/1e/44/acee0f7d60f362/WO2011015922A1.pdf> (дата обращения: 06.10.2020).

128. Frierson J. G. The yellow fever vaccine: a history // *Yale J Biol Med.* – 2010. – T. 83, № 2. – С. 77-85.
129. Pastoret P. P. Human and animal vaccine contaminations // *Biologicals.* – 2010. – T. 38, № 3. – С. 332-4.
130. Velthove K. J., Over J., Abbink K., Janssen M. P. Viral safety of human plasma-derived medicinal products: impact of regulation requirements // *Transfus Med Rev.* – 2013. – T. 27, № 3. – С. 179-83.
131. Hollak C. E., vom Dahl S., Aerts J. M., Belmatoug N., Bembi B., Cohen Y., Collin-Histed T., Deegan P., van Dussen L., Giraldo P., Mengel E., Michelakakis H., Manuel J., Hrebicek M., Parini R., Reinke J., di Rocco M., Pocovi M., Sa Miranda M. C., Tyłki-Szymanska A., Zimran A., Cox T. M. Force majeure: therapeutic measures in response to restricted supply of imiglucerase (Cerezyme) for patients with Gaucher disease // *Blood Cells Mol Dis.* – 2010. – T. 44, № 1. – С. 41-7.
132. Berting A., Farcet M. R., Kreil T. R. Virus susceptibility of Chinese hamster ovary (CHO) cells and detection of viral contaminations by adventitious agent testing // *Biotechnol Bioeng.* – 2010. – T. 106, № 4. – С. 598-607.
133. Department of Health and Human Services F., US. Guidance for Industry Q5A Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived From Cell Lines of Human or Animal Origin // *Book Guidance for Industry Q5A Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived From Cell Lines of Human or Animal Origin / Editor U.S. Department of Health and Human Services*
Food and Drug Administration, 1998.
134. ICH. Q5A R1 Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. – 2006. – URL: https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-5-r1-viral-safety-evaluation-biotechnology-products-derived-cell-lines-human-animal-origin_en.pdf (дата обращения: 20.04.2020).

135. Кудашева Э. Ю., Борисевич И. В., Иванов В. И., Конилова О. Г., Лебединская Е. В., Бунятян Н. Д. Современные технологические подходы к обеспечению вирусной безопасности препаратов иммуноглобулинов человека // Успехи современного естествознания. – 2015. № 5. – С. 7.

136. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Note for Guidance on Virus Validation Studies: the Design, Contribution and Interpretation of Studies Validating the Inactivation and Removal of Viruses // Book Note for Guidance on Virus Validation Studies: the Design, Contribution and Interpretation of Studies Validating the Inactivation and Removal of Viruses / Editor. – London, 1996.

137. Perez M., Rodriguez E., Rodriguez M., Paez R., Ruibal I., Noa E., Garcia O., Moya G., Martinez M., Marcelo J., Martinez A., Dubal M., Navea L., Valdes R. Validation of model virus removal and inactivation capacity of an erythropoietin purification process // Biologicals. – 2011. – Т. 39, № 6. – С. 430-7.

138. Иванов Р., Секарёва Г., Кравцова О., Кудлай Д., Лукьянов С., Тихонова И., Дёмин А., Максумова Л., Никитина И., Обухов А., Зайцев Д., Степанов А., Носырева М., Самсонов М. Правила проведения исследований биоаналоговых лекарственных средств (биоаналогов) // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2014. – Т. 1. – С. 21-36.

139. Group I. E. W. Quality risk management Q9. – 2005. – URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-3.pdf (дата обращения: 09.03.2020).

140. -MAb: A Case Study in Bioprocess Development. 2009.

141. Alt N., Zhang T. Y., Motchnik P., Taticek R., Quarmby V., Schlothauer T., Beck H., Emrich T., Harris R. J. Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles // Biologicals. – 2016. – Т. 44, № 5. – С. 291-305.

142. Welply J. K., Howard S. C., Wittwer A. J. EP0420833A1 Method of increasing specific activity of t-PA. – 1989. – URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/a4/de/4f/5143fec0384538/EP0420833A1.pdf> (дата обращения: 05.05.2019).

143. Chen P., Harcum S. W. Effects of elevated ammonium on glycosylation gene expression in CHO cells // *Metab Eng.* – 2006. – Т. 8, № 2. – С. 123-32.

144. Lewis A. M., Croughan W. D., Aranibar N., Lee A. G., Warrack B., Abu-Absi N. R., Patel R., Drew B., Borys M. C., Reily M. D., Li Z. J. Understanding and Controlling Sialylation in a CHO Fc-Fusion Process // *PLoS One.* – 2016. – Т. 11, № 6. – С. e0157111.

145. Gramer M. J., Goochee C. F. Glycosidase activities in Chinese hamster ovary cell lysate and cell culture supernatant // *Biotechnol Prog.* – 1993. – Т. 9, № 4. – С. 366-73.

146. Bandyopadhyay S., Mendiratta S. K., Bandyopadhyay S. A novel process for the purification of Tissue Plasminogen Activator // *Book A novel process for the purification of Tissue Plasminogen Activator / Editor, 2012.*

147. Maheshwari S. S., Mishpar K., Bhandari P. US9943575B2 Pharmaceutical compositions of tenecteplase. – 2012. – URL: <https://patents.google.com/patent/US9943575B2/en> (дата обращения: 05.09.2019).

148. Maheshavari K. M., Singh S., Mehta S. R. 262723 A process for the preparation of the biologically active product –2014. – URL: <https://www.allindian-patents.com/patents/262723-a-process-for-the-preparation-of-biologically-active-product> (дата обращения: 18.07.2019).

149. Pabst T. M., Wendeler M., Wang X., Bezemer S., Hermans P., Hunter A. K. Camelid V(H) H affinity ligands enable separation of closely related biopharmaceuticals // *Biotechnol J.* – 2017. – Т. 12, № 2.

150. Григорьева О. В., Завальный М. А., Карпов А. П., Петров А. В., Фабричный И. П., Шустер А. М. RU 2500817 C1 Рекомбинантная плазмидная ДНК рВК415, кодирующая полипептид рекомбинантного тканевого активатора

плазминогена человека, линия клеток *Cricetulus griseus* CHO 1F8 -- продуцент рекомбинантного тканевого активатора плазминогена человека и способ получения и выделения полипептида, обладающего активностью тканевого активатора плазминогена. – 2012. – URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/b6/05/ba/55fa45c126c294/RU2500817C1.pdf> (дата обращения: 03.06.2019).