

## Методические подходы к валидации технологических процессов получения терапевтических рекомбинатных белков на основе концепции «Quality by Design»

Н. В. Стратонова<sup>1\*</sup>, А. С. Лисов<sup>1</sup>, А. Н. Морозов<sup>2</sup>, Д. В. Тюпа<sup>2</sup>, Р. А. Хамитов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ»,

ул. Тестовская, д. 10, офис 214, Москва, 123317, Российская Федерация

<sup>2</sup> Общество с ограниченной ответственностью «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ»,

ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

Валидация технологических процессов на основе концепции «качество, встроенное при разработке» (Quality by Design, QbD) требует глубокого научного понимания процессов и повышения их устойчивости путем внедрения новых технологий. Цель данной работы заключалась в обосновании методологического подхода на основе концепции QbD к валидации промышленного производства активной фармацевтической субстанции (АФС) дорназы альфа. Для этого было определено технологическое пространство процесса в демасштабированной модели — реакторах объемом 2 л; доказана репрезентативность данной модели по независимым от масштаба реактора параметрам; установлено сходство гидродинамических условий, конструктивных особенностей и режимов работы реакторов лабораторных, опытно-промышленных и промышленного объемов; показана масштабируемость процесса посредством демонстрации многовариантной математической модели PCA (Principal Component Analysis), перекрывающей объемы 2–1000 л, включающей входные, выходные параметры процесса и параметры качества продукта для ряда продуцентов рекомбинатных терапевтических белков, созданных на основе той же клеточной линии CHO и экспрессионной конструкции, что и продуцент дорназы альфа. Обоснована применимость инженерного пространства, которое определяется сочетанием конструктивных особенностей биореакторов и технологических параметров процесса, к различным масштабам путем проведения трех процессов в опытно-промышленном масштабе 100 л и двух процессов в промышленном масштабе 1000 л и построении на основе полученных данных модели PCA.

**Ключевые слова:** валидация; дорназа альфа; технологическое пространство; Quality by Design; инженерное пространство

**Для цитирования:** Стратонова НВ, Лисов АС, Морозов АН, Тюпа ДВ, Хамитов РА. Методические подходы к валидации технологических процессов получения терапевтических рекомбинатных белков на основе концепции «Quality by Design». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2018;18(3):175–183. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-175-183>

**Контактное лицо:** Стратонова Наталия Валерьевна; stratonova@ibcgenerium.ru

## Methodological Approaches to Validation of Therapeutic Recombinant Proteins Production Based on the Quality by Design Concept

N. V. Stratonova<sup>1\*</sup>, A. S. Lisov<sup>1</sup>, A. N. Morozov<sup>2</sup>, D. V. Tyupa<sup>2</sup>, R. A. Khamitov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Joint-Stock company «GENERIUM»,

office 214, 10 Testovskaya St., Moscow 123317, Russian Federation

<sup>2</sup> Limited Liability Company «International Biotechnology Center «GENERIUM»,

14 Vladimirskaya St., Volginsky town, Petushinsky District, Vladimir Region 601125, Russian Federation

Validation of production processes based on the Quality by Design (QbD) principles calls for thorough scientific understanding of the processes and enhancement of their stability by implementation of new technologies. The aim of the study consisted in substantiating a QbD-based technological approach to validation of commercial production of dornase alfa. For this purpose a design space was established in a scale-down model, i.e. 2 L reactors; the model was shown to be representative in terms of all parameters except for the reactor size; the similarity of hydrodynamic conditions, design characteristics and operation modes of laboratory, pilot and commercial scale reactors was established; the process scalability was demonstrated by using the PCA (Principal Component Analysis) multivariate mathematical model including the volume range of 2–1000 L, input and output process parameters and product quality attributes for a number of recombinant therapeutic products derived from the same CHO cell line and expression construction as dornase alfa producer. The article demonstrates the applicability of engineering space, which includes bioreactor design features and production process parameters, to different production scales by implementing 3 processes at the pilot scale (100 L) and 2 processes at the commercial scale (1000 L) and building a PCA model based on the obtained data.

**Key words:** validation; dornase alfa; design space; Quality by Design; engineering space

**For citation:** Stratonova NV, Lisov AS, Morozov AN, Tyupa DV, Khamitov RA. Methodological approaches to validation of therapeutic recombinant proteins production based on the Quality by Design concept. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2018;18(3):175–183. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-175-183>

**Corresponding author:** Nataliya V. Stratonova; stratonova@ibcgenerium.ru

В настоящее время в разработке биологических лекарственных средств (ЛС) все чаще используется подход «качество, встроенное при разработке» (Quality by Design, QbD), основанный на использовании научных знаний, результатов исследований и оценки рисков для выявления и понимания характеристик сырья и параметров процесса, влияющих на критические показатели качества продукта. Данный подход изложен в руководствах ЕврАЭС [1], ICH [2–5] и документе Product Development and Realisation Case Study A-Mab [6], составленном ведущими фармацевтическими компаниями.

Валидация технологического процесса в рамках подхода QbD, в отличие от традиционной валидации, основанной на проведении трех последовательных процессов производственного масштаба, включает совокупность данных и информации, полученных на всех этапах жизненного цикла продукта — от раннего этапа разработки до промышленного производства. Непрерывная верификация процесса обеспечивает его глубокое научное понимание и уверенность, что процесс будет гарантировать получение продукта с надлежащими параметрами качества.

Вместе с тем в нашей стране данный подход еще мало используется для снижения производственных и регуляторных рисков.

Цель работы — обоснование методологического подхода к валидации процесса промышленного получения активной фармацевтической субстанции (АФС) дорназы альфа на основе концепции QbD к разработке лекарственных средств и непрерывной валидации в ходе жизненного цикла продукта.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1) определить технологическое пространство (Design Space) процесса культивирования продуцента дорназы альфа на основании данных, полученных при разработке и характеристике процесса в демасштабированной модели — реакторах объемом 2 л, включающее в себя независимые от масштаба параметры и показывающее корреляцию между параметрами процесса и качеством целевого продукта (модель 1);

2) обосновать, что демасштабированная модель процесса культивирования продуцента дорназы альфа в объеме 2 л является репрезентативной и на основании полученных в ней данных возможно прогнозирование крупномасштабных производственных процессов, и, соответственно, технологическое пространство, разработанное для процесса культивирования продуцента дорназы альфа в биореакторах объемом 2 л, применимо к процессам в других объемах:

- показать сходство гидродинамических условий, конструктивных особенностей и режимов работы реакторов лабораторных, опытно-промышленных и промышленного объемов;

- показать масштабируемость процесса культивирования посредством демонстрации многовариантной математической модели PCA, перекрывающей объемы 2–1000 л, для ряда продуцентов рекомбинантных терапевтических белков, созданных на основе той же клеточной линии и экспрессионной конструкции, что и продуцент дорназы альфа;

3) продемонстрировать применимость разработанного технологического пространства к различным масштабам и обосновать инженерное пространство (Engineering Design Space) процесса культивирования дорназы альфа, которое определяется сочетанием конструктивных особенностей биореакторов и технологических параметров процесса, путем проведения трех процессов в опытно-промышленном масштабе 100 л и двух процессов в промышленном масштабе 1000 л и построения на основе полученных данных модели PCA (Principal Component Analysis) (модель 2);

4) создать многовариантную модель PLS процесса получения дорназы альфа для проведения непрерывной верификации процесса в ходе промышленного производства и доказательства того, что процесс является контролируемым.

### Материалы и методы

Продуцент рекомбинантной дорназы альфа (дезоксирибонуклеазы I) получен при стабильной трансфекции суспензионной клеточной линии CHO-M экспрессионной ДНК-конструкцией. В процессе культивирования целевой белок дорназа альфа экспрессировался в культуральную жидкость, а затем белок подвергали хроматографической очистке.

При разработке и характеристике процесса культивирования продуцента дорназы альфа использовали лабораторные реакторы объемом 2 л (Biostat B (Sartorius Stedim Biotech, Германия)). Для процессов опытно-промышленного масштаба использовали пилотные реакторы объемом 100 л (HyClone SUB 100, Thermo Fisher Scientific, США). Для коммерческого производства процесс масштабировали до промышленного объема 1000 л (HyClone SUB 1000, Thermo Fisher Scientific, США).

Для получения посевного материала культуру продуцента, хранящуюся в парах жидкого азота, расконсервировали и культивировали в жидкой питательной среде в колбах Эрленмейера и далее в волновых реакторах с рабочим объемом 5–20 л, перевеивая культуру каждые 72 ч.

Посевной материал переносили в производственный реактор и проводили процесс культивирования для получения целевого белка. Продуцент дорназы альфа культивировали на питательной среде SFM4CHO (HyClone, GE Healthcare, США) с добавлением питательных добавок Balan CD CHO Feed 3 (Irvine Scientific) и Balan CD CHO Feed 2 (Irvine Scientific). Заданное значение pH в процессе культивирования поддерживали подачей раствора гидроксида натрия и углекислого газа.

В ходе процесса контролировали содержание растворенного кислорода (датчик Hamilton, США), растворенного углекислого газа (датчик Mettler Toledo 4100), показатели pH (датчик Mettler Toledo), температуры, концентрацию глюкозы (анализатор Biosen C-line), а также вели мониторинг концентрации лактата (анализатор Biosen C-line), концентрации клеток и жизнеспособности культуры (метод подсчета в камере Горяева при окрашивании трипановым синим).

По окончании процесса культивирования определяли активность целевого белка в культуральной жидкости методом колориметрии. Полученную культуральную жидкость осветляли методом глубинной фильтрации и подвергали пятистадийной хроматографической очистке, после чего получали АФС дорназы альфа, которую анализировали, определяя содержание дезамидированной формы целевого белка методом ВЭЖХ; мономера, фрагментов и агрегатов методом гелевой фильтрационной ВЭЖХ; специфическую активность целевого белка методом колориметрии; содержание остаточных белков продуцента методом ИФА; содержание остаточной ДНК продуцента методом ПЦР.

Для построения математических моделей PCA и PLS (Partial Least Squares model) использовали программное обеспечение SIMCA (UMETRICS, Швеция).

Объемный коэффициент массопередачи кислорода  $k_L$  определяли динамическим методом, предварительно удаляя из тестовой среды растворенный кислород путем барботирования через нее азота, а затем измеряя скорость насыщения среды кислородом при подаче кислорода или воздуха в биореактор через микробарботер. Скорость удаления  $\text{CO}_2$  также определяли динамическим методом, предварительно насыщая

перед началом каждого эксперимента тестовую среду смесью воздуха/азота с 30 % CO<sub>2</sub> до равновесного состояния, а затем удаляя растворенный CO<sub>2</sub> путем барботирования воздухом/кислородом через микро- или макробарботер или подачи воздуха через головное пространство реактора над поверхностью жидкости. Матрица экспериментов была составлена в программе MODDE (UMETRICS, Швеция).

## Результаты и обсуждение

### Технологическое пространство процесса производства дорназы альфа

Данные, полученные при разработке и характеризации процесса культивирования продуцента дорназы альфа в демасштабированной модели в лабораторных реакторах объемом 2 л, использовали для анализа корреляции между рабочими параметрами процесса, независимыми от объема культивирования (температура, pH, концентрации растворенных кислорода, углекислого газа, глюкозы), выходными параметрами процесса (максимальная концентрация клеток, конечная жизнеспособность культуры, конечное содержание биомассы, максимальная концентрация лактата, активность целевого белка в культуральной жидкости, продолжительность процесса) и качеством продукта (содержание дезамидированной формы целевого белка, агрегатов, специфическая активность, содержание остаточных белков и ДНК продуцента).

Корреляция между параметрами процесса и качеством продукта проанализирована, в том числе путем построения математической модели с использованием метода частных наименьших квадратов (PLS). В модель PLS (модель 1) были включены 17 переменных, указанных выше, которые были выбраны, исходя из их значимости для продуктивности процесса и качества продукта.

Анализ модели PLS показывает, что пять основных компонентов объясняют 94,8 % варибельности данных; таким образом, фиксируются все существенные тенденции и корреляции в наборе данных ( $R^2X = 0,948$ ). Перекрестная проверка модели показала, что она прогнозирует 92,6 % вариаций будущих наблюдений ( $Q^2(\text{cum}) = 0,926$ ).

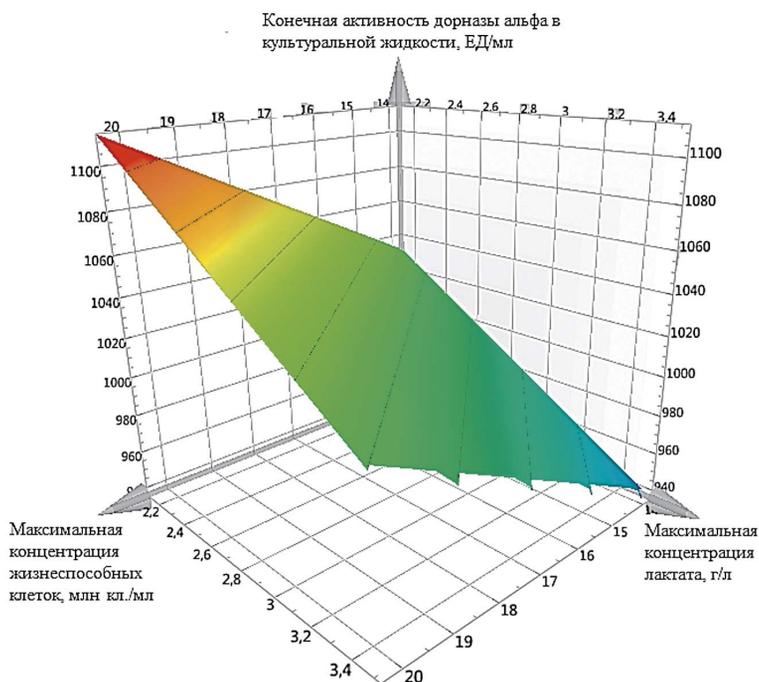
На рисунке 1 в качестве примера представлена диаграмма, полученная с помощью модели PLS, показывающая корреляцию между максимальной концентрацией жизнеспособных клеток, максимальной концентрацией лактата и конечной активностью целевого белка в культуральной жидкости.

Определение технологического пространства процесса получения дорназы альфа позволило установить границы рабочих параметров процесса, в рамках которых гарантируется получение продукта надлежащего качества.

### Применимость технологического пространства, разработанного в демасштабированной модели, к различным масштабам

Одним из главных условий для успешного масштабирования процесса культивирования является обеспечение равенства условий в различных объемах: в пилотном и промышленном объеме клетки должны находиться в той же микросреде и испытывать те же воздействия, что и в лабораторном масштабе при разработке процесса. От объема культивирования зависит гидродинамическая составляющая процесса и, соответственно, время смешения, гидродинамическое напряжение, оказываемое на клетки, массоперенос газов и субстрата. Кроме того, вследствие изменения гидродинамической составляющей процесса возможно появление градиентов pH, температуры, концентрации субстрата, концентраций растворенных кислорода и углекислого газа в культуральной среде.

Анализ взаимосвязи между конструкционными характеристиками биореактора, рабочими параметрами процесса куль-



**Рис. 1.** Корреляция между максимальной концентрацией жизнеспособных клеток, максимальной концентрацией лактата и конечной активностью дорназы альфа в культуральной жидкости при анализе модели PCA (модель 1) по первому основному компоненту модели  $t[1]$ .

**Fig. 1.** Correlation between the maximum concentration of viable cells, maximum lactate concentration and the dornase alpha final activity in the culture fluid, observed when analysing the PCA model (model 1) for the first major component of the  $t[1]$  model.

тивирования, возможностями контроля процесса в различных биореакторах, качеством продукта и производительностью процесса обеспечивает основу для научного понимания влияния масштаба на процесс культивирования и продукт и определяет инженерное пространство процесса культивирования продуцента дорназы альфа.

Для масштабирования процессов культивирования от объема 2 л до 100 и 1000 л использованы параметры, характеризующие гидродинамические условия и массоперенос, приведенные в таблице 1.

**Анализ конструкции биореакторов лабораторного, пилотного и производственного масштаба**

Биореакторы, использованные в лабораторном, пилотном и промышленном процессах культивирования продуцента дорназы альфа, показаны на рисунке 2. Основные конструктивные и инженерные характеристики биореакторов приведены в таблице 2.

Как видно из приведенных данных, биореакторы обладают высокой степенью геометрического подобия; имеют аналогичную конструкцию мешалки; конструкцию и расположение портов для внесения добавок, датчиков и барботеров; аналогичные возможности управления процессом.

Поскольку способ подачи газов является наиважнейшим аспектом процесса культивирования, в том числе вследствие стрессового воздействия на клетки микропузырьков, образующихся при подаче газов через микробарботер, в лабораторном, пилотном и промышленном биореакторах были использованы микробарботер и макробарботер для создания аналогичных условий во всех объемах.

**Обоснование масштабируемости процесса культивирования продуцента дорназы альфа в объеме 2–1000 л посредством демонстрации многовариантной математической модели РСА для продуцента, созданного на основе аналогичной клеточной линии, экспрессионной конструкции и сходного процесса культивирования, что и продуцент дорназы альфа**

Чтобы продемонстрировать применимость демасштабированной модели процесса культивирования в объеме 2 л для прогнозирования процесса в биореакторе объемом 1000 л, построена математическая модель РСА с использованием метода главных компонентов РСА. Она включает входные, выходные параметры процесса и параметры качества продукта для про-

**Таблица 1.** Параметры, характеризующие гидродинамические условия и массоперенос, используемые при масштабировании процесса культивирования продуцента дорназы альфа  
**Table 1.** Parameters characterising hydrodynamic conditions and mass transfer, used for scaling up the process of cultivation of dornase alfa producer

Параметр масштабирования	Уравнение
Геометрическое подобие и конструкция реакторов	-
Входящая удельная мощность мешалки, $P/V$	$\frac{P}{V} = \frac{N_p \rho d_i^5 N^3}{V}$
Окружная скорость мешалки ( $V_{tip}$ )	$V_{tip} = \pi N D$
Время смешения ( $\Theta_m$ )	$\Theta_m = \left(\frac{3,24}{N}\right) \left(\frac{d_v}{d_i}\right)^{2,2}$
Объемный коэффициент массопередачи кислорода $k_L a_{O_2}$	$k_L a \propto \left(\frac{P}{V}\right)^\alpha \left(\frac{Q_G}{S}\right)^\beta$
Объемный коэффициент массопередачи углекислого газа $k_L a_{CO_2}$	$k_L a \propto \left(\frac{P}{V}\right)^\alpha \left(\frac{Q_G}{S}\right)^\beta$

дучента рекомбинантного терапевтического белка, созданного на основе аналогичной клеточной линии, экспрессионной конструкции и сходного процесса культивирования, что и продуцент дорназы альфа.

Модель приведена на рисунке 3. Модель построена на основе данных для 15 процессов культивирования продуцента рекомбинантного терапевтического белка в объеме 1000 л. В модель РСА включены 12 переменных: максимальная концентрация клеток, конечная жизнеспособность культуры, конечная концентрация клеток, pH, концентрации глюкозы и лактата, максимальная концентрация лактата, концентрация целевого белка, конечное содержание биомассы и параметры качества продукта (гликозилирование (содержание маннозо-содержащих и галактозосодержащих гликанов) и содержание заряженных форм).

Анализ модели РСА показывает, что первые пять основных компонентов объясняют 98,2 % изменчивости данных ( $R^2X = 0,982$ ); модель прогнозирует 95,9 % вариаций будущих наблюдений ( $Q^2(\text{sim}) = 0,959$ ). На основе данных для произ-



**Рис. 2.** Биореакторы, применяемые для культивирования продуцента дорназы альфа: А — Biostat B (Sartorius) объемом 2 л; Б — Hyclone SUB100 объемом 100 л; В — Hyclone SUB1000 объемом 1000 л.  
**Fig. 2.** Bioreactors used for cultivation of dornase alfa producer: А — 2 L Biostat B (Sartorius); Б — 100 L Hyclone SUB100; В — 1000 L Hyclone SUB1000.

Таблица 2. Основные конструкционные и инженерные характеристики биореакторов  
 Table 2. Main design features and engineering characteristics of bioreactors

Параметр, размерность	Биореактор		
	Biostat B*	SUB100**	SUB1000***
Конструкционные характеристики биореакторов			
Общий объем, л	3	120	1320
Максимальный рабочий объем, л	2	100	1000
Минимальный рабочий объем, л	1,5	50	500
Диаметр емкости биореактора (D), мм	130	438	959
Высота емкости биореактора (H), мм	240	953	2007
Соотношение H/D, мм	1,8	2,2	1,9
Высота жидкости (hL), мм	180	660	1422
Соотношение hL/D	1,4	1,5	1,5
Число уровней мешалок	1	1	1
Диаметр мешалки (dl), мм	54	146	321
Соотношение dl/D	0,41	0,33	0,33
Отбойники	Отсутствуют		
Скорость перемешивания, об/мин	100–400	50–145	65–85
Удельный расход газа, vvm	Макробарботер (воздух)		
	0,02–0,03	0,005–0,02	0,003–0,015
	Микробарботер (воздух)		
	до 0,05	0,008–0,009	0,008–0,009
	Микробарботер (кислород)		
	до 0,003	0,0005–0,005	0,0005–0,004
Конструкция барботеров и их расположение	Микробарботер с диаметром пор 20 мкм и кольцевой макробарботер с диаметром пор 1 мм	Микробарботер с диаметром пор 20 мкм и макробарботер (трубка) диаметром 2 см	
Подача газов	Доставка кислорода путем аэрации воздухом и кислородом через микробарботер. Удаление CO <sub>2</sub> подачей воздуха через макробарботер		
Расположение портов для внесения добавок	В крышке биореактора	В нижней части реактора в зоне работы мешалки и в крышке реактора	
Способ внесения подпитки	Калибруемый внешний насос		
Расположение датчиков	В нижней части реактора в зоне работы мешалки		
Контроль содержания растворенного кислорода DO, pH, температуры	Да		
Инженерные характеристики биореакторов			
Входная мощность мешалки P/V, Вт/м <sup>3</sup>	40	20	20
Объемный коэффициент массопередачи кислорода (аэрация воздухом) $k_L a_{O_2}$ , ч <sup>-1</sup>	12–20	11–12	10–11
Объемный коэффициент массопередачи кислорода (аэрация кислородом) $k_L a_{O_2}$ , ч <sup>-1</sup>	До 50	До 50	–
Объемный коэффициент массопередачи углекислого газа $k_L a_{CO_2}$ , ч <sup>-1</sup>	–	0,85–1,50	0,70–1,35
Окружная скорость мешалки, м <sup>-1</sup>	0,4–1,10	0,34–1,11	0,75–1,42
Время смешения, с	5–10	15–50	26–50

\* Лабораторный биореактор Biostat B (Sartorius) объемом 2 л.

\*\* Пилотный биореактор Nyclone SUB100 объемом 100 л.

\*\*\* Промышленный биореактор Nyclone SUB1000 объемом 1000 л.

водственного объема 1000 л построен 95 % доверительный эллипсоид для пяти основных компонентов, а затем данные для 12 процессов культивирования продуцента рекомбинантного терапевтического белка в объеме 2 л использовали для прогнозирования пространственных координат этих процессов в многомерном пространстве, образованном процессами в производственном объеме 1000 л. Как показано на рисунке 3, процессы в объеме 2 л находятся в пределах многомерного 95 % доверительного эллипсоида процессов в объеме 1000 л, что указывает на то, что обе совокупности данных имеют сопоставимые тенденции и обладают аналогичными структурами корреляции.

Результат анализа математической модели PCA показывает достоверность применимости реактора объемом 2 л в качестве демасштабированной модели производственных биореакторов объемом 1000 л.

**Демонстрация применимости разработанного технологического пространства к различным масштабам и обоснование инженерного пространства (Engineering Design Space) процесса культивирования продуцента дорназы альфа**

Для оценки сопоставимости входных и выходных параметров процесса и качества продукта на основании данных по 17 переменным, полученным в процессах в объеме 2, 100 и 1000 л, построена математическая модель PCA (модель 2), которая является обоснованием инженерного пространства (Engineering Design Space) процесса культивирования продуцента дорназы альфа.

На данный момент модель PCA разработана с использованием данных о процессе и качестве продукта, полученных в ходе характеристики процесса (объем реактора 2 л, 20 процессов), а

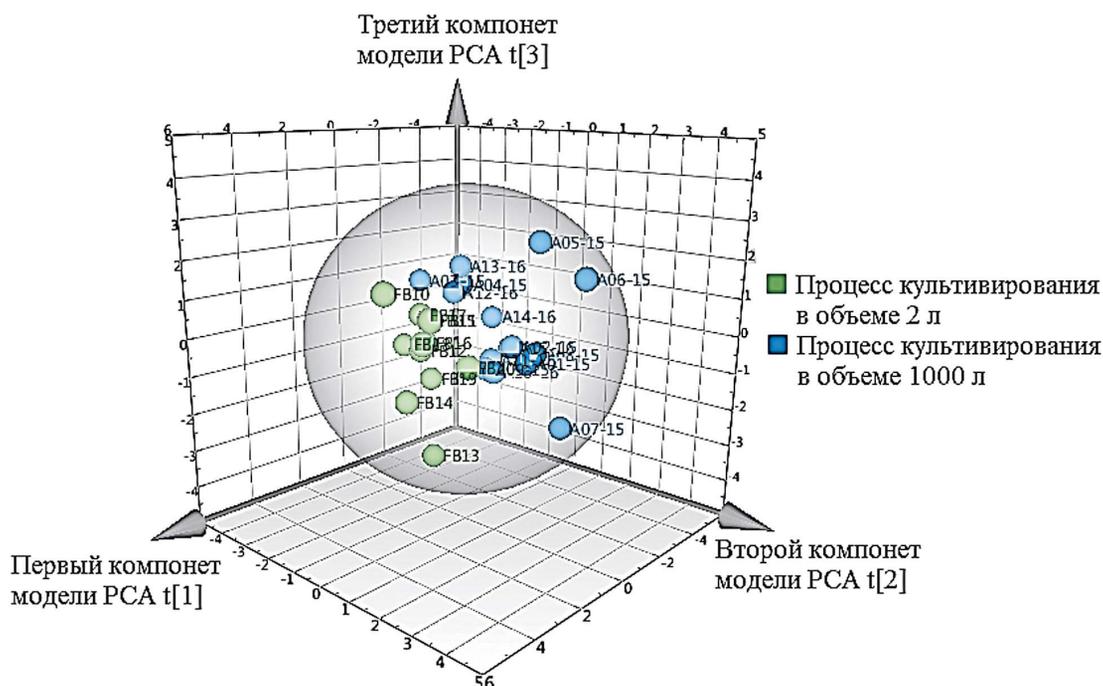
также трех процессов в 100 л, двух процессов в 1000 л, приведенных в таблице 3. После получения достаточного количества данных для производственного объема 1000 л модель PCA будет переработана для использования в непрерывном мониторинге процесса в промышленном производстве.

Результаты модели PCA показывают, что 6 основных компонентов объясняют 95,1 % изменчивости набора данных ( $R^2X = 0,951$ ). Перекрестная проверка модели показала, что она предсказывает 93,9 % вариаций будущих наблюдений ( $Q^2(\text{sim}) = 0,939$ ). Как показано на рисунке 4, процессы в объеме 100 и 1000 л находятся в пределах многомерного 95 % доверительного эллипсоида, построенного на основе данных о процессе и качестве продукта, полученных в объеме реактора 2 л.

**Непрерывная верификация процесса на основе модели PLS в промышленном производстве**

Данный подход к валидации технологического процесса отличается от традиционного подхода с проведением трех последовательных валидационных процессов промышленного объема. Фактически, данные по двум процессам в объеме 1000 л использовались для демонстрации валидности разработанного технологического пространства для процесса промышленного масштаба. В результате показано, что качество продукта и входные и выходные параметры процесса находятся в пределах установленных критериев приемлемости.

Поскольку два процесса в промышленном объеме не могут полностью охватить возможную изменчивость процесса, для того, чтобы гарантировать, что процесс промышленного производства находится в состоянии контроля на протяжении всего жизненного цикла, для непрерывной верификации процесса создана многомерная статистическая модель PLS.



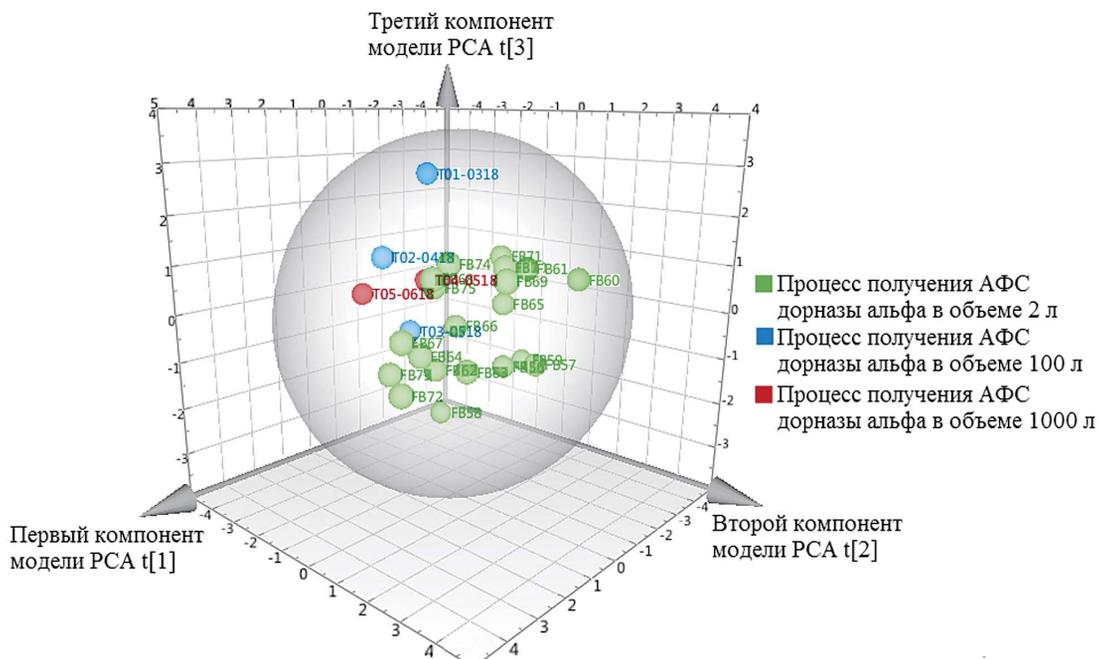
**Рис. 3.** Многомерный 95 % доверительный эллипсоид, построенный для процессов культивирования в объеме 1000 л, и прогнозируемые значения для процессов культивирования в объеме 2 л, определенные в модели PCA для продуцента рекомбинантного терапевтического белка, созданного на основе аналогичной клеточной линии, экспрессионной конструкции и сходного процесса культивирования, что и продуцент дорназы альфа.

**Fig. 3.** Multidimensional 95 % confidence ellipsoid built for cultivation processes in 1000 L reactors, and predicted values for cultivation in 2 L reactors that were established in the PCA model for the producer of the recombinant therapeutic protein derived from a similar cell line, expression construct and cultivation process as those used for the dornase alpha producer.

**Таблица 3.** Входные и выходные параметры процесса культивирования и параметры качества АФС дорназа альфа, полученные в лабораторном, опытно-промышленном и производственном масштабах

**Table 3.** Input and output data of the cultivation process, and quality attributes of the dornase alfa API obtained at laboratory, pilot and commercial production scales

Параметр процесса, размерность	Наименование биореактора		
	Biostat B (Sartorius)	Hyclone SUB100	Hyclone SUB1000
Входные параметры процесса			
Объем, л	2	100	1000
pH	6,90 ± 0,1	6,90 ± 0,05	6,90 ± 0,05
Температура	37 °C в первые 5 суток процесса, далее — 32 °C		
Концентрация глюкозы	3,5–0,5 г/л с 7 до 15 суток процесса		
Содержание CO <sub>2</sub>	3–8 % в первые 5 суток процесса, далее — не более 35 %		
Содержание O <sub>2</sub> , %	25–35	25–35	25–35
Выходные параметры процесса			
Максимальная концентрация клеток, млн кл./мл	15,8–20,4	13,7–17,7	15,5
Конечная жизнеспособность культуры, %	84–93	85–94	94
Конечное содержание биомассы, мл/л	28–37	34–35	34–35
Максимальная концентрация лактата, г/л	2,1–2,98	2,7–3,5	2,7–3,5
Активность целевого белка в культуральной жидкости, ЕД/мл	900–1200	943–1088	900–1000
Продолжительность процесса, сут	12–14	14	14
Параметры качества АФС дорназа альфа			
Содержание дезамидированной формы целевого белка, %	43–60	43,8–62,3	44–44,5
Содержание агрегатов, %	0,02–0,8	0,02–0,4	0,4–0,5
Специфическая активность, ЕД/мл	1100–1250	1003–1137	1116–1220
Содержание остаточных белков продуцента, нг/мг rDnz-α	0,3–10	0,3	0,3
Содержание остаточной ДНК продуцента, пг/мг rDnz-α	2–10	2	2



**Рис. 4.** 95 % доверительный эллипсоид модели PCA, построенный с использованием данных процессов в объеме 2 л (20 процессов), 100 л (3 процесса), 1000 л (2 процесса).

**Fig. 4.** PCA model 95 % confidence ellipsoid which was built using the data of production processes implemented using 2 L reactors (20 processes), 100 L reactors (3 processes), 1000 L reactors (2 processes).

Для непрерывного мониторинга производственного процесса использовались off-line (ежедневный контроль концентрации клеток, жизнеспособности, концентрации глюкозы, лактата и т.д.), а также on-line и in-line данные (рН, температура, концентрации растворенных кислорода и углекислого газа, расход газов, давление, вес реактора и т.д.). Модель PLS состоит из трех компонентов, которые совокупно объясняют 96,2 и 87,3 % вариации по данным X и Y соответственно ( $R^2(X) = 0,962$ ,  $R^2(Y) = 0,873$ ). Кроме того, модель имеет высокую прогностическую мощь ( $Q^2(\text{sim}) = 0,854$ ). Контрольная диаграмма траектории первого основного компонента статистической модели PLS  $t[1]$ , его допустимого диапазона и траектории двадцати процессов в объеме 2 л, трех процессов в 100 л, двух процессов в 1000 л приведена на рисунке 5.

Метод многомерного моделирования для периодических процессов отображает динамическую природу процесса, характеризует технологическое пространство, в котором протекает процесс, и определяет границы процесса. Мониторинг в режиме реального времени обеспечивает постоянный контроль производства и раннее обнаружение трендов процесса.

### Выводы

Для обоснования подхода к валидации процесса промышленного получения дорназы альфа, основанного на концепции QbD, решены следующие задачи:

1) определено технологическое пространство (Design Space) процесса культивирования продуцента дорназы альфа, включающее в себя независимые от масштаба параметры и показывающее корреляцию между параметрами процесса и качеством целевого продукта (модель 1);

2) обоснована демасштабированная модель процесса культивирования продуцента дорназы альфа в объеме 2 л;

3) показана применимость разработанного технологического пространства к различным масштабам; показана

сопоставимость АФС дорназы альфа, полученной в объеме 2, 100 и 1000 л (табл. 3), и таким образом подтверждено инженерное пространство процесса культивирования продуцента дорназы альфа (модель 2);

4) для проведения непрерывной верификации процесса в ходе промышленного производства и доказательства того, что процесс является контролируемым, создана многовариантная модель PLS процесса получения АФС дорназы альфа. Таким образом, два процесса в объеме 1000 л являются стартовой точкой непрерывной верификации процесса и подхода к валидации как к части жизненного цикла продукта, и требования GMP к квалификации процесса соблюдены.

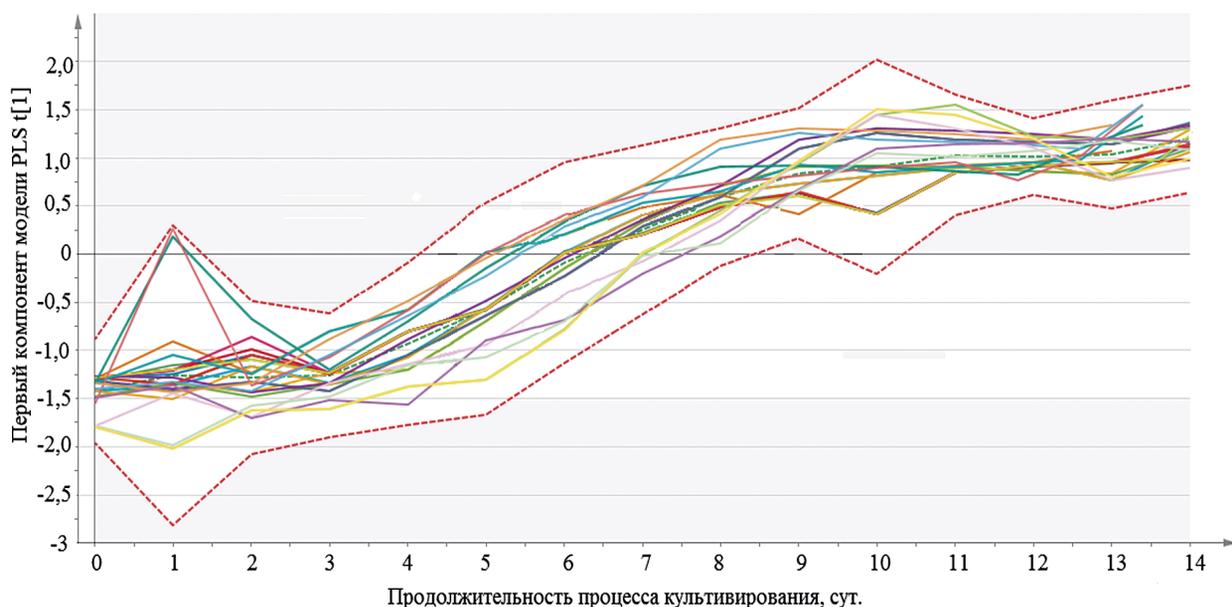
Подход к валидации технологического процесса на основе концепции QbD включает совокупность данных и информации, полученных на всех этапах жизненного цикла продукта, что обеспечивает глубокое понимание процесса и позволяет внедрить в рутинное производство непрерывную верификацию процесса и, соответственно, гарантировать получение продукта с надлежащими параметрами качества.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность за помощь в проведенной работе сотрудникам отдела аналитических методов ООО «МБЦ «ГЕНЕРИУМ» под руководством А.Ю. Вишневого. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

**Acknowledgments.** The authors are thankful for the help of specialists of the Analytical Methods Department at LLC IBC «GENERIUM» guided by Vishnevsky A.Y. This research received no specific grant from any funding agency.

**Информация об отсутствии конфликта интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.



**Рис. 5.** Контрольная диаграмма траектории первого основного компонента статистической модели PLS  $t[1]$  (---), его допустимого диапазона (среднее значение  $\pm 3$  ст. откл. (- - -)) и траектории двадцати процессов в объеме 2 л, трех процессов в 100 л, двух процессов в 1000 л.

**Fig. 5.** Control chart of the trajectory of the first major component of the PLS  $t[1]$  statistical model (---), its acceptable range (mean value  $\pm 3$  st. dev. (- - -)) and the trajectory of twenty production processes implemented using 2 L reactors, three processes using 100 L reactors, and two processes using 1000 L reactors.

## Литература / References

1. Руководство по валидации процесса производства лекарственных препаратов для медицинского применения. Приложение к Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26 сентября 2017 г. № 19. [Guidance on Validation Production Process of Medicinal Products for Medical Use. Annex to the Recommendation of the Eurasian Economic Commission Board of 26 September, 2017 No 19 (In Russ.)]. Available from: <http://docs.cntd.ru/document/456095627>
2. ICH Q11 Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities) Q11; 2012. Available from: [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q11/Q11\\_Step\\_4.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q11/Q11_Step_4.pdf)
3. ICH Q12 Technical and Regulatory Considerations for Pharmaceutical Product Lifecycle Management Q12; 2017. Available from: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q12/Q12\\_DraftGuideline\\_Step2\\_2017\\_1116.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q12/Q12_DraftGuideline_Step2_2017_1116.pdf)
4. ICH Q10 Pharmaceutical Quality System Q10; 2008. Available from: [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q10/Step4/Q10\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q10/Step4/Q10_Guideline.pdf)
5. ICH Q9 Quality Risk Management Q9; 2005. Available from: [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q9/Step4/Q9\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q9/Step4/Q9_Guideline.pdf)
6. A-Mab: a Case Study in Bioprocess Development. CMC Biotech Working Group. Version 2.1. Product Development and Realisation Case Study A-Mab; 2009. Available from: [https://cdn.ymaws.com/www.casss.org/resource/resmgr/imported/A-Mab\\_case\\_study\\_Version\\_2-1.pdf](https://cdn.ymaws.com/www.casss.org/resource/resmgr/imported/A-Mab_case_study_Version_2-1.pdf)

## Об авторах

**Стратонова Наталья Валерьевна**, канд. биол. наук, начальник Управления экспериментального производства АО «ГЕНЕРИУМ», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-9555-1950>

**Лисов Антон Сергеевич**, старший технолог Управления экспериментального производства АО «ГЕНЕРИУМ», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6716-9570>

**Морозов Антон Николаевич**, начальник отдела разработки процессов ООО «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6960-6148>

**Тюпа Дмитрий Валерьевич**, научный сотрудник отдела разработки процессов ООО «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2399-4434>

**Хамитов Равиль Авгатович**, д-р мед. наук, профессор, генеральный директор ООО «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-1314-894X>

Поступила 26.07.2018

Принята к публикации 09.08.2018

## Authors

**Nataliya V. Stratonova**, Candidate of Biological Sciences, Head of the Experimental Production Department of the Joint-Stock Company «GENERIUM», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-9555-1950>

**Anton S. Lisov**, Senior Technology Specialist of the Experimental Production Department of the Joint-Stock Company «GENERIUM», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6716-9570>

**Anton N. Morozov**, Head of the Department for Technological Process Development of the Limited Liability Company «International Biotechnology Center «GENERIUM», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6960-6148>

**Dmitry V. Tyupa**, Staff Scientist of the Department for Technological Process Development of the Limited Liability Company «International Biotechnology Center «GENERIUM», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2399-4434>

**Ravil A. Khamitov**, Doctor of Medical Science, Professor, General Director of the Limited Liability Company «International Biotechnology Center «GENERIUM», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-1314-894X>

Received 26 July 2018

Accepted 9 August 2018