



Опыт масштабирования и интенсификации промышленного производства векторной аденовирусной вакцины Гам-КОВИД-Вак в лимитирующих условиях пандемии

А.Н. Морозов, И.Р. Яхин, Н.В. Стратонова, М.В. Куцкир, Д.А. Потеряев✉, Р.А. Хамитов

Акционерное общество «Генериум», ул. Тестовская, д. 10, Москва, 123112, Российская Федерация

✉ Потеряев Дмитрий Александрович; poteryaev@ibcgenerium.ru

Резюме

Пандемия COVID-19 явилась глобальным вызовом для системы здравоохранения. За более чем 200 лет, прошедших с момента первого массового применения вакцин, эпидемиологи всего мира убедились, что именно эффективные вакцины являются ключевым инструментом в борьбе с опасными инфекционными заболеваниями, особенно эпидемического и пандемического характера. В условиях быстро распространяющейся пандемии нового инфекционного агента не только разработка принципиально новых вакцинных препаратов, но и возможность быстро организовать крупномасштабное производство приобретают решающее значение. В Российской Федерации коллективом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России в 2020 г. была разработана инновационная векторная вакцина Гам-КОВИД-Вак для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2. Перед рядом отечественных биофармацевтических предприятий была поставлена задача ее производства. Цель работы – оптимизация технологии производства вакцины Гам-КОВИД-Вак для масштабирования и наращивания объема выпуска. В ходе работы были решены следующие задачи: установлены критические атрибуты качества продукта и оптимизированы аналитические методы для их контроля; выявлены технологические стадии, плохо поддающиеся масштабированию; оптимизирован технологический процесс перед переносом в производство; модифицированы немасштабируемые/нетехнологичные стадии. В результате работы был налажен массовый выпуск субстанции обоих компонентов Гам-КОВИД-Вак, позволивший не только обеспечить высокую потребность в вакцине для иммунопрофилактики COVID-19 в Российской Федерации, но и осуществлять поставки данной вакцины в ряд зарубежных стран.

Ключевые слова: COVID-19; SARS-CoV-2; аденовирус; вакцина; производство; разработка вакцинных препаратов

Для цитирования: Морозов А.Н., Яхин И.Р., Стратонова Н.В., Куцкир М.В., Потеряев Д.А., Хамитов Р.А. Опыт масштабирования и интенсификации промышленного производства векторной аденовирусной вакцины Гам-КОВИД-Вак в лимитирующих условиях пандемии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(4):382–391. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-382-391>

An experience of scaling and intensifying the industrial production of the Gam-COVID-Vac vector adenovirus vaccine in the limiting conditions of the pandemic

A.N. Morozov, I.R. Yakhin, N.V. Stratonova, M.V. Kutskir, D.A. Poteryaev✉, R.A. Khamitov

Generium JSC, 10 Testovskaya St, Moscow 123112, Russian Federation

✉ Dmitry A. Poteryaev; poteryaev@ibcgenerium.ru

Abstract

The COVID-19 pandemic has presented a global challenge to the health system. More than 200 years of world epidemiological experience since the first mass use of vaccines have convincingly shown that effective vaccines are the key tools in the fight against dangerous infectious diseases, especially epidemic and pandemic ones. In the context of a rapidly spreading pandemic of a new infectious agent, it is crucial not only to develop fundamentally new vaccines, but also to be able to quickly organise their large-scale production. In the Russian Federation, in 2020, a team of the National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya developed an innovative vector vaccine, Gam-COVID-Vac, for the prevention of coronavirus disease caused by the SARS-CoV-2 virus. A number of pharmaceutical companies faced the challenge of producing the vaccine. The aim of the study was to optimise the production technology of Gam-COVID-Vac for scaling and increasing the production capacity. In the course of the work, the authors established critical quality attributes of the product, optimised analytical methods for their control, identified poorly scalable technological stages, streamlined the technological process before its transfer to production, and modified non-scalable and technologically unfeasible stages. The work resulted in the launch of industrial-scale production of active pharmaceutical ingredients for both components of Gam-COVID-Vac, which made it possible not only to meet the critical need for COVID-19 immunoprophylaxis in the Russian Federation, but also to supply this vaccine to a number of foreign countries.

Key words: COVID-19; SARS-CoV-2; adenovirus; vaccine; industrial production; vaccine development

For citation: Morozov A.N., Yakhin I.R., Stratonova N.V., Kutskir M.V., Poteryaev D.A., Khamitov R.A. An experience of scaling and intensifying the industrial production of the Gam-COVID-Vac vector adenovirus vaccine in the limiting conditions of the pandemic. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(4):382–391. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-382-391>

Введение

Пандемия COVID-19 явилась глобальным вызовом для системы здравоохранения всего мира. В Российской Федерации коллективом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России была разработана инновационная векторная вакцина Гам-КОВИД-Вак для иммунопрофилактики COVID-19. Данная вакцина продемонстрировала свою эффективность и безопасность в ходе клинических исследований [1, 2]. В 2020 г. между АО «Генериум» и ФГБУ «НИЦЭМ им.

Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России был заключен договор на контрактное производство как готовой лекарственной формы (ГЛФ), так и субстанции – раствора Гам-КОВИД-Вак для дальнейшего изготовления ГЛФ на других контрактных площадках Российской Федерации и за рубежом¹. Необходимость масштабирования производства вакцины для обеспечения высокой потребности в ней как в Российской Федерации, так и за рубежом² стала серьезной задачей для коллектива АО «Генериум», от решения ко-

¹ https://www.generium.ru/about/press_center/company_news/generium-zapustil-proizvodstvo-vaktsiny-sputnik-v/

² <https://pharmmedprom.ru/news/v-2021-godu-rossiya-otpravila-za-rubezh-v-20-raz-bolshe-vaktsin-chem-v-2020-i-eto-ne-predel/>

торой зависела возможность проведения массовой вакцинации против COVID-19. Решение данной задачи осложнялось следующими лимитирующими факторами, характерными для пандемии COVID-19:

- отсутствие опыта масштабирования и крупнотоннажного производства векторных вакцин в Российской Федерации;
- отсутствие или недостаток необходимого производственного и аналитического оборудования и материалов, сроки поставки которых значительно увеличились ввиду нарушенных пандемией логистических связей;
- чрезвычайно сжатые сроки для налаживания промышленного выпуска вакцины;
- отсутствие резервных мощностей у компаний-производителей.

За 13 лет своего существования АО «Генериум» накопило большой опыт не только разработки различного рода терапевтических биомолекул, но и масштабирования процесса их производства. АО «Генериум» производит целый ряд сложных рекомбинантных белков по так называемому «полному циклу», от культивирования клеток-продуцентов до готовой лекарственной формы. Примерами являются рекомбинантные ферменты для ферментозаместительной терапии наследственных заболеваний или моноклональные антитела для аутоиммунных заболеваний³. Накопленный опыт работы с культурами эукариотических клеток и масштабирования процессов культивирования и очистки активных фармацевтических ингредиентов был непосредственно применен и к производству векторной вакцины Гам-КОВИД-Вак.

Цель работы – оптимизация технологии производства вакцины Гам-КОВИД-Вак для масштабирования и наращивания объема выпуска. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: определение критических атрибутов качества продукта и оптимизация аналитических методов для их контроля; выявление технологических стадий, плохо поддающихся масштабированию; оптимизация технологического процесса перед переносом в производство путем модификации немасштабируемых или нетехнологичных стадий.

Основная часть

Первым шагом в разработке процесса производства лекарственного средства является выявление критических показателей качества

(critical quality attribute, CQA) согласно Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии⁴. Для контроля CQA требуется разработка специфических аналитических методов, которые в дальнейшем будут использоваться на производственной площадке и в подразделениях контроля качества для контроля процесса производства и продукта. Путем определения критических параметров процесса (critical process parameter, CPP), влияющих на CQA, формируется контрольная стратегия производства лекарственного средства [3, 4].

Перенос технологического процесса от лабораторного к промышленному производству

При переносе технологии от лабораторного масштаба к промышленному предстояло решить три принципиальные задачи:

- установить CQA продукта, оптимизировать аналитические методы для контроля CQA;
- оптимизировать технологический процесс перед переносом в производство, модифицировать немасштабируемые/нетехнологичные стадии;
- установить потенциальные CPP процесса и разработать стратегию контроля процесса производства на основе риск-ориентированного подхода.

Гам-КОВИД-Вак – двухкомпонентная вакцина, в которой использованы рекомбинантные аденовирусы 26 (компонент I, Ad26) и 5 (компонент II, Ad5) серотипов [5]. В аденовирусный геном произведена вставка гена, кодирующего целевой антиген – немодифицированный полноразмерный S-белок коронавируса SARS-CoV-2. Для производства аденовирусной вакцины Гам-КОВИД-Вак используется клеточная линия HEK-293, адаптированная к росту в суспензии. Используемые аденовирусы являются репликативно-некомпетентными, поскольку из их генома удалены гены, обеспечивающие размножение вируса и развитие продуктивной вирусной инфекции в нормальных клетках человека. Клетки HEK-293, напротив, по принципу комплементарной экспрессии способны обеспечивать размножение аденовирусов, поскольку стабильно трансформированы недостающим участком генома аденовируса. Полученные аденовирусы могут размножаться только в особой клеточной культуре, в условиях, созданных для этого в биореакторе. После накопления биомассы и многостадийной очистки вирусных

³ <https://www.generium.ru/products/>

⁴ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 22.12.2020 № 26 «О Руководстве по разработке и производству активных фармацевтических субстанций».

частиц получают препарат, являющийся эффективной системой для векторной доставки, обеспечивающей последующую экспрессию антигена в антигенпрезентирующих клетках человека и последующую индукцию как клеточного, так и гуморального иммунитета. Вместе с тем такие вирусные векторные вакцины обладают высоким профилем безопасности.

Основными CQA векторной вакцины Гам-КОВИД-Вак являются две категории показателей: параметры эффективности и параметры безопасности. К параметрам эффективности относятся следующие показатели: иммуногенность (проверяется для каждой партии выпущенной вакцины на иммунизированных животных путем определения титра антител, выработанных к S-белку SARS-CoV-2); тканевая цитопатогенная доза (ТЦД₅₀ или инфекционный титр устанавливается на клетках HEK-293); размер микроагрегатов аденовирусных частиц (если таковые образуются); соотношение пустых и полных вирусных капсидов. К параметрам безопасности относятся следующие показатели: присутствие репликативно-компетентных аденовирусов (replication-competent adenovirus, RCA) [6], выявляемых на клетках линии карциномы легкого A549; наличие примесей, связанных с процессом производства, таких как ДНК, остаточные белки клетки-хозяина, эндонуклеаза. Важнейшим параметром безопасности является контроль контаминации посторонними агентами: микоплазма, аэробные и анаэробные бактерии, грибы, возможная перекрестная контаминация культуры продуцента аденовирусами серотипов Ad5 и Ad26 [7].

На рисунке 1 приведен пример определения соотношения пустых и полных вирусных капсидов с помощью аналитического ультрацентрифугирования. Данный метод был предложен разработчиками вакцины и внедрен в систему контроля качества при производстве на площадке АО «Генериум». Кроме того, что соотношение пустых и полных капсидов является качественным параметром, этот метод также использовался для оценки продуктивности культуры в биореакторе.

Масштабирование отдельных этапов технологического процесса

В процессе трансфера технологии от разработчика вакцины при проведении пилотных экспериментов по масштабированию технологии производства на площадке АО «Генериум» в исходной лабораторной технологии были выявлены несколько стадий, которые оказались немасштабируемыми или нетехнологичными

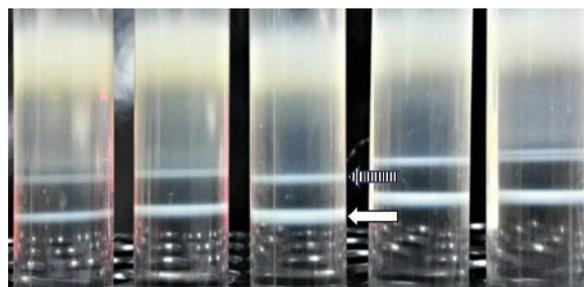


Рис. 1. Результаты аналитического центрифугирования аденовирусных частиц в градиенте хлорида цезия. Верхняя зона (обозначена полосатой стрелкой) – фракция пустых капсидов (не содержащие ДНК аденовирусы), нижняя зона (обозначена белой стрелкой) – фракция полных вирусных частиц. Условия центрифугирования – центрифуга Optima AUC XP (Beckman Coulter) с ротором An-60 Ti (в течение 2,5 ч при 2900 g).

Fig. 1. Results of analytical centrifugation of adenovirus particles in a cesium chloride gradient. The upper disk (striped arrow) consists of empty capsids, i.e. adenoviruses not containing DNA; the lower disk (white arrow) consists of full capsids. Centrifugation was performed for 2.5 hours at 2900 g using an Optima AUC XP centrifuge with an An-60 Ti rotor (Beckman Coulter).

для промышленного производства (табл. 1). Данные стадии необходимо было модифицировать или заменить.

На рисунках 2А и 2В представлена блок-схема процесса культивирования рекомбинантных аденовирусных частиц после оптимизации производственного процесса.

Выбор типа биореактора. Согласно технологии, разработанной ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, процесс накопления вирусных частиц в клетках HEK-293 происходил в волновом биореакторе (Biostat RM 20/50, Sartorius) объемом от 5 до 20 л. Основная проблема данного подхода состояла в том, что вследствие конструктивных особенностей оборудования волновой реактор может быть масштабирован только до рабочего объема 100 л, что, очевидно, недостаточно для крупномасштабного производства. Кроме того, в волновом реакторе с рабочим объемом 100 л гидродинамические характеристики (а стало быть, и продуктивность) значительно хуже, чем в его лабораторной версии, что делает экстенсивный подход к масштабированию в случае волнового реактора фактически невозможным. Таким образом, масштабирование производства путем увеличения количества единиц волновых реакторов не смогло бы обеспечить требуемый уровень выпуска вакцины (до десятков миллионов доз в месяц). По этой причине в АО «Генериум» весь этап адаптации и оптимизации технологии и последующее производство вакцины были выполнены в классических биореакторах с осе-

Таблица 1. Этапы лабораторного технологического процесса производства вакцины Гам-КОВИД-Вак и сложности масштабирования процесса

Table 1. Scalability of Gam-COVID-Vac production stages from laboratory to industrial process

Этап лабораторного процесса <i>Laboratory process stage</i>	Лимитирующая стадия / Сложность масштабирования <i>Limiting stage / Scalability issues</i>
Культивирование культуры НЕК-293 в колбах и волновом биореакторе объемом 5 л <i>HEK-293 cultivation in flasks and a 5-litre wave bioreactor</i>	Стадия культивирования в волновом реакторе / Волновой реактор может быть масштабирован только до объема 100 л, что недостаточно для промышленного производства <i>Wave-reactor cultivation / Scalability of a wave reactor is limited to 100 L, which is not enough for industrial production</i>
Осаждение и концентрирование клеток НЕК-293, содержащих вирус, путем центрифугирования <i>Precipitation and concentration of virus-containing HEK-293 cells by centrifugation</i>	Стадия высокоскоростного центрифугирования / Стадию невозможно провести в закрытой системе; принципиальная необходимость данной стадии в производственном масштабе отсутствует <i>High-speed centrifugation / This stage cannot be carried out in a closed system; there is no fundamental need for this stage at the industrial scale</i>
Лизис клеток путем замораживания–оттаивания, обработки химическими детергентами, бензоной <i>Cell lysis by freeze–thaw cycles, treatment with chemical detergents and benzonase</i>	Стадия лизиса клеток путем замораживания–оттаивания / Невозможно проведение в больших объемах Включение в технологический процесс коммерческого фермента бензоной / Проблемы с поставкой и высокая стоимость фермента <i>Freeze–thaw cell lysis / It is not possible in large volumes The use of a commercial benzonase enzyme in the technological process / Problems with the supply and high cost of the enzyme</i>
Очистка вируса методами гель-фильтрации, анионообменной и мультимодальной хроматографии; диафильтрация и концентрирование, фильтрация концентрата через фильтр с размером пор 0,2 мкм <i>Purification of the virus by size-exclusion, anion-exchange, and multimodal chromatography; diafiltration and concentration, filtration of the concentrate through a 0.2-µm filter</i>	Стадия очистки вируса методом гель-фильтрации / Невозможно использовать в крупномасштабном процессе очистки вирусных частиц Диафильтрация / Стадия диафильтрации приводит к существенным потерям вирусных частиц <i>Size-exclusion chromatography / The method cannot be used in a large-scale vaccine purification process Diafiltration / Diafiltration results in a substantial loss of virus particles</i>

вым механическим перемешиванием (рис. 2А, стадия ТП.3.5). Культивирование в биореакторе с осевым механическим перемешиванием, по сравнению с волновым биореактором позволяет масштабировать процесс до целевого объема 2000 л, являющегося максимальным на данный момент для одноразовых биореакторов, а также достичь лучшего массообмена и повысить контролируемость параметров процесса культивирования. Отработку культивирования проводили в демасштабированной модели с рабочим объемом 1–2 л, учитывающей основные гидродинамические характеристики промышленных биореакторов (Biostat B-twin, Sartorius). Для культивирования в объемах 100–200 л использовались биореакторы SUB-100 (HyClone) и BIOSTAT CultuBag STR 200L (Sartorius).

Подбор оптимальной множественности заражения культур клеток. Важным фактором при культивировании вируса в культуре клеток НЕК-293 является подбор оптимального количества вносимого вирусного инокулята, т.е. множественности заражения (multiplicity of infection, MOI) [7]. Избыток заражающей дозы может при-

вести к цитотоксичности, ранней гибели клеток и преждевременному завершению процесса, а недостаток – к неполному заражению клеток, перерастанию биомассы и, как следствие, недостатку питательных веществ на этапе накопления вируса, что ведет к существенной потере продуктивности. Нами было отмечено, что оценку эффективности заражения и накопления вирусных частиц можно проводить по графику расхода кислорода в ходе процесса культивирования. Полное заражение клеточной биомассы выражается в резком изменении динамики потребления кислорода через 12–16 ч после заражения, без стадии замедления и плато (рис. 3). В случае оптимально подобранной дозы заражения процесс развивается по сценарию, отображенному на рисунке зеленым цветом, и характеризуется максимальным выходом вирусных частиц.

Оптимизация стадии лизиса клеток. В соответствии с лабораторной технологией после стадии культивирования требовалось отделение клеток, содержащих вирусные частицы, от культуральной жидкости центрифугированием при 5000 g.

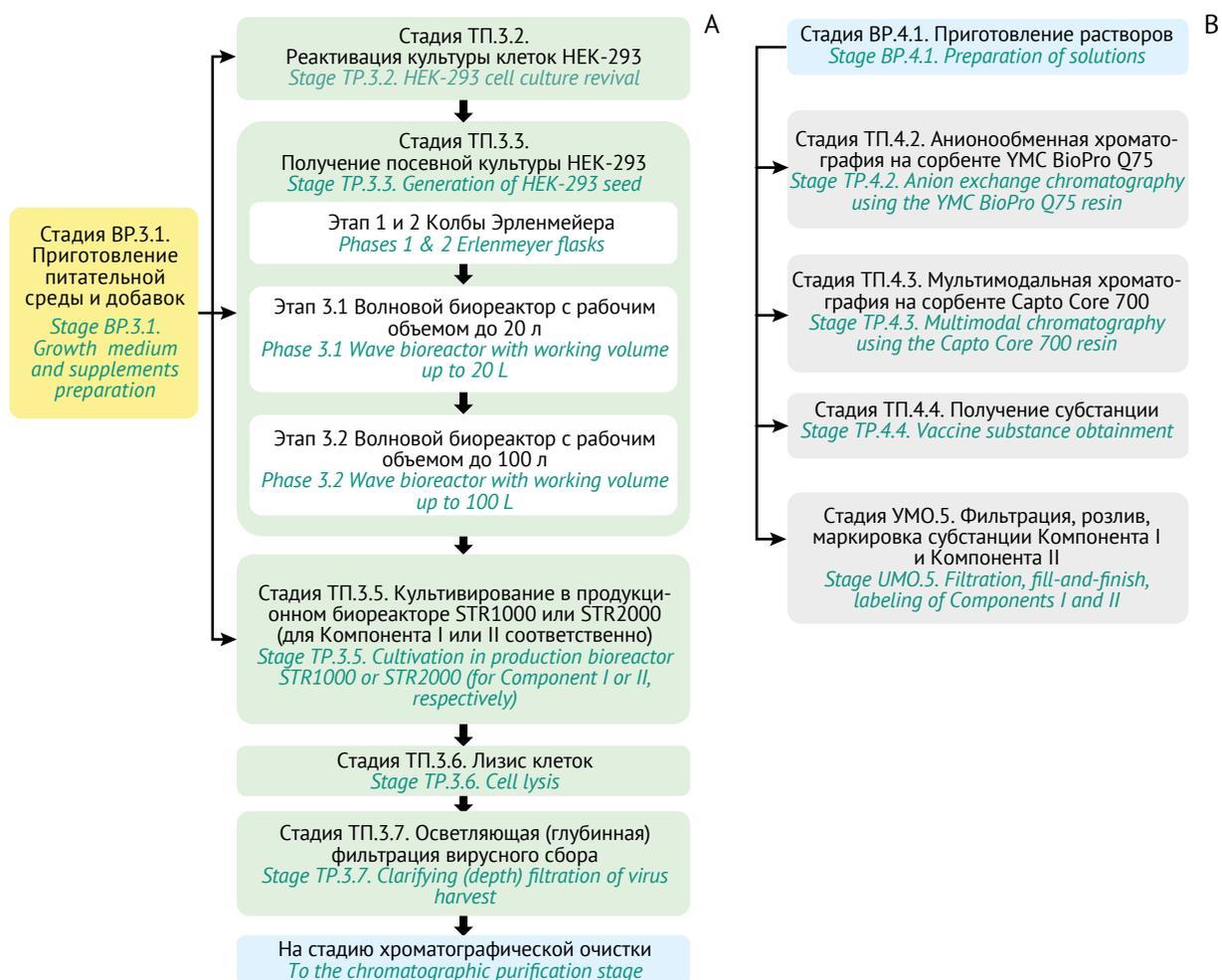


Рис. 2. Краткая блок-схема процесса культивирования рекомбинантных аденовирусных частиц и последующих промежуточных стадий (А) и процесса хроматографической очистки вирусных частиц (В).

Fig. 2. Abbreviated flowcharts of the cultivation of recombinant adenovirus particles with subsequent intermediate stages (A) and the purification of virus particles by chromatography (B).

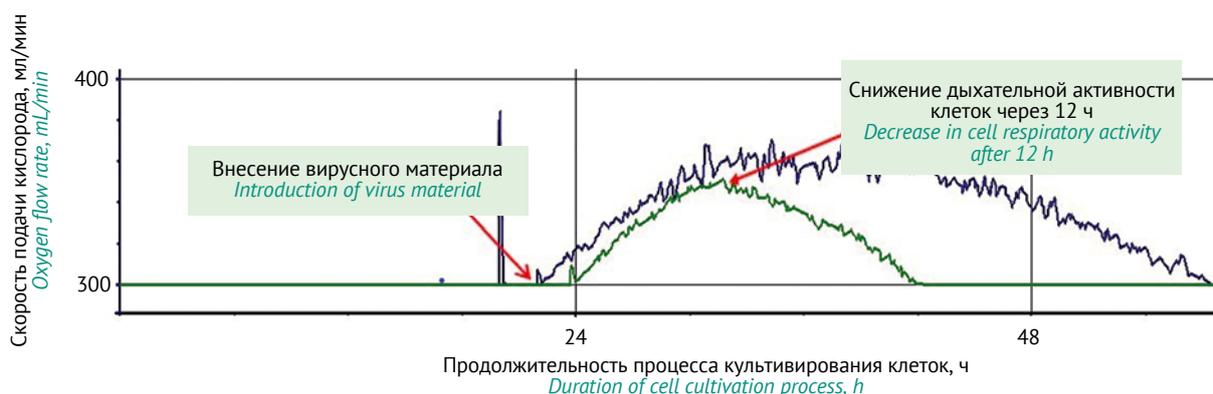


Рис. 3. Скорость подачи кислорода в ходе процесса культивирования на этапе внесения вирусного инокулята. Кривая зеленого цвета — полное заражение клеток вирусным инокулятом, оптимальная продуктивность наработки вируса; кривая синего цвета — неполное заражение клеток вирусным инокулятом, низкая продуктивность наработки вируса.

Fig. 3. Oxygen supply rate during the culture process at the viral inoculum introduction stage. The green curve indicates complete infection of cells by the viral inoculum (optimal productivity and virus harvest); the blue one shows incomplete infection of cells by the viral inoculum (low productivity and virus harvest).

Далее следовало разрушение клеток методом замораживания–оттаивания с последующим разбавлением 0,5 М раствором хлорида натрия и повторным осаждением центрифугированием. Существенным недостатком являлась невозможность проведения стадий в закрытой системе, а также отсутствие принципиальной необходимости и целесообразности в проведении данных стадий в связи с непропорциональным увеличением трудо- и времязатрат при объемах культивирования 100 л и невозможностью проведения данных манипуляций в адекватные сроки при объемах 1000 и более литров [8].

В связи с этим для оптимизации технологии вместо центрифугирования и замораживания–оттаивания клеток проводился химический лизис непосредственно в производственном биореакторе, представляющем собой закрытую систему, после окончания процесса культивирования, путем внесения неионогенного детергента Tween 20 (A4974, Applichem) до концентрации 0,5% в промежуточный продукт (рис. 2А, стадия ТП.3.6). Поскольку аденовирусные частицы не содержат липидов в своей оболочке, использование неионогенных поверхностно-активных веществ, к которым относится Tween 20, не повреждает вирусные капсиды, в то же время эффективно высвобождает их из клеток.

Для снижения содержания высокомолекулярных ДНК и РНК клеток HEK-293, а также уменьшения вязкости лизата требуется внесение фермента бензоназы [9] – эндонуклеазы бактериального происхождения, эффективно разрушающей нуклеиновые кислоты. Использование коммерческого фермента сопряжено с логистическими рисками сбоя поставок, а также высокими финансовыми затратами. По этой причине замена на фермент собственного производства с аналогичной активностью позволяет снизить риски и себестоимость процесса производства. Для этого в АО «Генериум» была проведена разработка технологии собственного производства рекомбинантной эндонуклеазы из бактерии *Serratia marcescens*. Ген эндонуклеазы был клонирован для экспрессии в *E. coli*. Производство эндонуклеазы в биореакторе позволило закрыть потребность в этом ферменте и избавиться от импортозависимости по такому критическому параметру. При проведении лизиса клеток вносили 100 Ед/мл фермента совместно с 2 мМ $MgCl_2$.

Стадия глубокой фильтрации. Поскольку стадия центрифугирования клеточного лизата не является масштабируемой [9], осветление полученного лизата в производственных условиях проводили методом глубокой фильтрации (рис. 2А, стадия ТП.3.7). Данный способ

широко распространен в биофармацевтической промышленности, достаточно легко масштабируется и может быть реализован в закрытых системах. Наиболее доступным материалом для глубокого фильтра является модифицированная целлюлоза с дзета-потенциалом, имеющим слабую анионообменную функцию. Фильтры из этого материала способны задерживать частицы, не только отсекая их по размеру, но и за счет электрокинетической адсорбции. При этом данный материал не оказывает негативного влияния на целевой продукт.

На рисунке 4 показан внешний вид модульной установки таких фильтров. Лизат последовательно проходит через кассеты с глубинными фильтрами с постепенно уменьшающимся размером пор, от 9 до 0,2 мкм, обеспечивая эффективное осветление жидкости.

Оптимизация стадии хроматографической очистки вирусных частиц. Одной из стадий хроматографической очистки вирусосодержащей субстанции в лабораторной технологии была препаративная гель-фильтрационная хроматография. Учитывая, что для данного типа хроматографии необходим объем сорбента,



Рис. 4. Модульная установка двухступенчатой осветляющей фильтрации лизата клеток HEK-293, содержащего аденовирусные частицы (фото АО «Генериум»).

Fig. 4. A modular unit for two-stage clarification filtration of HEK-293 cell lysate containing adenoviral particles (photo Generium JSC).

сопоставимый с объемом стартового материала, данная стадия была признана нетехнологичной. Особенности стартового материала для гель-фильтрационной хроматографии приводили к быстрому выходу из строя сорбента и невозможности его регенерации. В результате оптимизации стадии хроматографической очистки при масштабировании технологии производства были введены анионообменная и мультимодальная хроматографии (рис. 2В, ТП.4.2 и ТП.4.3). Стадии гель-фильтрации и диафильтрации были исключены из процесса производства. Диафильтрация несмотря на то что, в принципе, является масштабируемой стадией, была исключена по причине существенных и неконтролируемых потерь вирусных частиц (доходящих до 50%). Исключение диафильтрации не имело негативного эффекта, поскольку две хроматографические стадии (захватывающая анионообменная хроматография и мультимодальная хроматография с эффектом гель-фильтрации) обеспечивают чистоту целевого продукта. Помимо повышения технологичности процесса, условия хроматографической очистки были оптимизированы для предотвращения агрегации вирусных частиц. Образование агрегатов вирусных частиц размером выше определенного размера приводит к потерям продукта при стерилизующей фильтрации; дальнейшее увеличение размеров агрегатов снижает стабильность продукта при хранении и потенциально может негативно сказаться на иммуногенности препарата. Для рутинного контроля в промышленном производстве были установлены следующие нормы для средних размеров вирусных частиц и их агрегатов: Ad26 – не более 140 нм, Ad5 – не более 200 нм. Вирусные частицы Ad5 имеют большую склонность к агрегации, поэтому для него порог был установлен ниже, чем для Ad26. Выпускающий контроль предприятия подтверждает, что оптимизированный промышленный процесс хроматографической очистки позволяет получать субстанцию, соответствующую установленным нормам по содержанию примесей, связанных с процессом производства, такими как остаточная ДНК, остаточные белки клетки-хозяина и эндонуклеаза.

Предотвращение перекрестной контаминации

Производство вакцины в промышленных объемах предъявляло жесткие требования к предотвращению контаминации посторонними микроорганизмами и кросс-контаминации разными серотипами аденовируса.

Проблемы предотвращения контаминации при масштабировании и производстве вакци-

ны были решены в результате комплексных мероприятий. Была организована новая производственная площадка с разделением потоков материалов и персонала и строгим зонированием стадий технологических процессов и независимых компонентов вакцины. Для предотвращения случайной контаминации культуры HEK-293 проводился рутинный контроль клеточной культуры и продукта методом ПЦР.

Организация новой производственной площадки базировалась на нескольких основополагающих принципах:

- разделение зон производства на чистую (культура HEK-293) и осуществляющую работу с вирусом (накопление и очистка вирусных частиц);
- разделение производства компонентов вакцины (Ad5 и Ad26) на этапе культивирования и хроматографии;
- культивирование HEK-293 в одноразовых биореакторах объемом 1000 и 2000 л;
- хранение осветленного лизата в одноразовых миксерах объемом 1500–2500 л;
- хроматографическая очистка с использованием хроматографов производительностью до 2000 л/ч.

Предотвращение контаминации кроме уже упомянутого рутинного контроля клеточных культур и продукта с помощью ПЦР достигалось следующими мерами:

- разделением площадки производства вакцины на три зоны: чистую, производство компонента Ad5 и производство компонента Ad26. Персонал, работающий на производстве Ad5, не допускался в помещения производства Ad26 и наоборот;
- максимальным использованием одноразовых материалов, закрытых систем, одноразовой одежды;
- все материалы, которые выходят из «заразной» зоны, должны пройти обеззараживание путем автоклавирования;
- использованием перекиси водорода в виде мелкодисперсного аэрозоля для дезинфекции при подготовке помещений и, при необходимости, после окончания цикла работ. Для ежедневной обработки использовался раствор 3% H₂O₂, для генеральной уборки – 6% H₂O₂;
- использованием вентиляции помещений, обеспечивающим полную смену воздуха, без частичной рециркуляции.

Промышленное производство и инспекция ВОЗ

Краткие схемы технологических процессов биосинтеза и очистки рекомбинантных аденовирусных частиц приведены на рисунке 2. Дан-

ные схемы характеризуют стандартный процесс производства вакцины Гам-КОВИД-Вак на производственной площадке АО «Генериум».

В июне 2021 г. в рамках предварительной квалификации вакцины ВОЗ на производственной площадке АО «Генериум» прошел аудит ВОЗ. Принципиальная схема новой производственной площадки (потoki, зонирование, организация производства) и предложенная контрольная стратегия процесса были одобрены инспекцией. В 2021 г. в АО «Генериум» было запущено две площадки для производства субстанции Гам-КОВИД-Вак с общим объемом биореакторов 8 т.

Заключение

Проведено успешное промышленное масштабирование производства вакцины Гам-КОВИД-Вак на площадке АО «Генериум». Достигнуто увеличение объема культивирования клеток –

производителей вирусных частиц с 1 до 2000 л, с приемлемым выходом и соблюдением атрибутов качества продукта. В ходе работы установлены критические атрибуты качества продукта и оптимизированы аналитические методы для их контроля; выявлены технологические стадии, плохо поддающиеся масштабированию; оптимизирован технологический процесс перед переносом в производство; модифицированы немасштабируемые/нетехнологичные стадии. В результате налажен массовый выпуск субстанций обоих компонентов Гам-КОВИД-Вак, позволивший не только обеспечить высокую потребность в вакцине для иммунопрофилактики COVID-19 в Российской Федерации, но и осуществлять поставки данной вакцины в ряд зарубежных стран. В октябре 2021 г. был обеспечен выпуск субстанции-раствора Гам-КОВИД-Вак для производства 100 миллионов доз вакцины.

Литература/References

- Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tuhvatulin AI, Shcheblyakov DV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020;396(10255):887–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
- Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheblyakov DV, Tuhvatulin AI, Zubkova OV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*. 2021;397(10275):671–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8)
- Mohammed AQ, Sunkari PK, Srinivas P, Roy AK. Quality by design in action 1: controlling critical quality attributes of an active pharmaceutical ingredient. *Org Process Res Dev*. 2015;19(11):1634–44. <https://doi.org/10.1021/OP500295A>
- Стратонова НВ, Лисов АС, Морозов АН, Тюпа ДВ, Хамитов РА. Методические подходы к валидации технологических процессов получения терапевтических рекомбинантных белков на основе концепции «Quality by Design». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(3):175–83. [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):175–83. (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-175-183>
- Zubkova OV, Ozharovskaia TA, Dolzhnikova IV, Popova O, Shcherbakov DV, Grousova DM, et al. Immunobiological agent for inducing specific immunity against severe acute respiratory syndrome virus SARS-CoV-2. WO2021002776A1; 2021.
- Wissing S, Faust N, Scheer N. Overview: manufacturing adenoviral vectors at large scale: how to select the best process and cell line to avoid RCA formation. *Gen Eng Biotech News*. 2021;41(10):35. <https://doi.org/10.1089/gen.41.10.12>
- Joe CCD, Jiang J, Linke T, Li Y, Fedosyuk S, Gupta G, et al. Manufacturing a chimpanzee adenovirus-vectored SARS-CoV-2 vaccine to meet global needs. *Biotechnol Bioeng*. 2022;119(1):48–58. <https://doi.org/10.1002/bit.27945>
- Srivastava A, Mallela KMG, Deorkar N, Brophy G. Manufacturing challenges and rational formulation development for AAV viral vectors. *J Pharm Sci*. 2021;110(7):2609–24. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.03.024>
- Kawka K, Wilton AN, Madadkar P, Medina MFC, Lichty BD, Ghosh R, Latulippe DR. Integrated development of enzymatic DNA digestion and membrane chromatography processes for the purification of therapeutic adenoviruses. *Sep Purif Technol*. 2021;254(1):117503. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117503>

Вклад авторов. А.Н. Морозов – разработка процессов производства, написание текста рукописи; И.Р. Яхин – разработка апстрим-процессов производства, написание текста рукописи; Н.В. Стратонова – масштабирование процессов производства; М.В. Куцкир – разработка даунстрим процессов производства;

Authors' contributions. A.N. Morozov—development of the manufacturing processes, writing of the manuscript; I.R. Yakhin—development of the upstream manufacturing processes, writing of the manuscript; N.V. Stratonova—scaling up of the manufacturing processes; M.V. Kutskir—development of the downstream

Д.А. Потеряев – критическое обсуждение, написание, доработка текста рукописи; **Р.А. Хамитов** – разработка концепции масштабирования производства, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Благодарности. Авторы благодарны сотрудникам компании АО «Генериум», непосредственно участвовавшим в масштабировании и производстве вакцины Гам-КОВИД-Вак, а также сотрудникам административно-хозяйственных подразделений компании, обеспечивших бесперебойную поставку сырья и оборудования в сложных логистических условиях пандемии.

Конфликт интересов. Р.А. Хамитов является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

manufacturing processes; **D.A. Poteryaev**—critical revision, writing, and finalisation of the manuscript; **R.A. Khamitov**—development of the scale-up concept, approval of the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements. The authors express gratitude to the employees of Generium JSC, who were directly involved in the scaling and production of the Gam-COVID-Vac vaccine, as well as to the employees of the administrative and economic divisions of the company, who ensured the uninterrupted supply of raw materials and equipment in the challenging logistical conditions of the pandemic.

Conflict of interest. R.A. Khamitov is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Об авторах / Authors

Морозов Антон Николаевич, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6960-6148>
morozov@ibcgenerium.ru

Яхин Ильдар Ряшитович, канд. биол. наук.
yakhin@ibcgenerium.ru

Стратонова Наталия Валерьевна, канд. биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9555-1950>
Stratonova@ibcgenerium.ru

Куцкир Максим Валерьевич, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3603-0004>
m.kutskir@generium.ru

Потеряев Дмитрий Александрович, канд. биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2695-8869>
poteryaev@ibcgenerium.ru

Хамитов Равиль Авгатович, д-р мед. наук, проф.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>
Khamitov@ibcgenerium.ru

Anton N. Morozov, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6960-6148>
morozov@ibcgenerium.ru

Ildar R. Yakhin, Cand. Sci. (Biol.).
yakhin@ibcgenerium.ru

Natalya V. Stratonova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9555-1950>
Stratonova@ibcgenerium.ru

Maksim V. Kutskir, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3603-0004>
m.kutskir@generium.ru

Dmitry A. Poteryaev, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2695-8869>
poteryaev@ibcgenerium.ru

Ravil A. Khamitov, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>
Khamitov@ibcgenerium.ru

Поступила 07.07.2022

После доработки 19.09.2022

Принята к публикации 07.12.2022

Received 7 July 2022

Revised 19 September 2022

Accepted 7 December 2022