

重组蛋白生物制品灌流培养工艺及药学评价考量

邱 晓, 赛文博, 寇雅真, 韦 薇

(国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100022)

[摘要] 灌流培养作为一种连续细胞培养技术, 较传统批量生产工艺有利于企业生产成本控制, 并根据供应需求灵活调整规模。本文对比了传统批量发酵工艺与灌流工艺, 明确了灌流培养工艺特点。结合国际人用药品注册技术协会目前正在起草的指导原则, 本文从细胞传代稳定性研究、批次及规模定义、生产工艺控制、外源因子控制、生产工艺验证等方面, 总结了灌流培养工艺药学评价的考量内容。

[关键词] 灌流培养; 连续生产; 细胞传代稳定性; 工艺控制; 工艺验证

[中图分类号] R965.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)02-0138-05

Considerations on pharmaceutical evaluation of perfusion fermentation of recombinant protein biological products

QIU Xiao, SAI Wen-bo, KOU Ya-zhen, WEI Wei

(Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China)

[Abstract] As a continuous cell culture technology, perfusion fermentation is more beneficial to cost control than traditional batch fermentation and can be flexibly arranged according to the supply change. In this paper, the characteristics and advantages of perfusion fermentation are clarified by comparing the batch fermentation with perfusion fermentation. In combination with the guidelines currently being drafted by the International Council on Harmonization, the considerations for pharmaceutical evaluation of cell passage stability study, batch and scale definition, process control, viral safety, and process verification of perfusion fermentation are summarized in this paper.

[Key words] perfusion fermentation; continuous manufacturing; cell passage stability; process control; process verification

重组蛋白类生物制品原液的生产传统上分为 2 个主要步骤: 上游(细胞培养和目标蛋白的表达)和下游(蛋白的纯化和制备成原液)。随着重组蛋白生物制品行业发展, 人们对重组蛋白类生物制品的质量属性和工艺理解日渐累积, 加之行业竞争日益激烈、成本压力增大、法规政策的变化等, 部分重组蛋白类生物制品企业正在逐渐探索将传统的批量生产变更为连续制造。灌流培养是一种连续细胞培养

工艺, 目前, 已有多个采用灌流培养工艺进行生产的重组生物制品在我国获批上市^[1], 对于灌流培养工艺的药学评价, 仍有待制定更为系统的技术要求, 目前国际人用药品注册技术协调会(International Council on Harmonisation, ICH)指导原则《原料药和制剂的连续制造》正在征求公众意见阶段, 尚未发布正式版本^[2]。美国 FDA 曾经就小分子和固体口服制剂的连续生产质控考量点发布了指导原则征求意见稿, 提及部分考量要点也可供生物制品参考^[3]。此外, 美国 FDA 就治疗用生物制品连续生产工艺中病毒去除/灭活的小规模验证问题进行了研究, 并发表了研究论文^[4]。我国尚无相关的指导原则可供

[作者简介] 邱晓, 女, 副主任药师, 主要从事生物制品药学审评工作。联系电话: (010)85243001, E-mail: qiux@cde.org.cn。

[通讯作者] 韦薇, 女, 主任药师, 主要从事生物制品药学审评工作。联系电话: (010)85243075, E-mail: weiw@cde.org.cn。

参考,笔者根据实际工作经验,并结合 ICH 相关指导原则,在本文中讨论了上游采用灌流工艺进行发酵生产,下游仍采用常规非连续批生产纯化模式的原液生产工艺的药学评价考量,以期对相关企业提供可供借鉴的参考。

1 灌流培养工艺特点

目前重组生物制品常见的发酵模式为批量培养:批培养和补料批培养。在批培养生产模式下,细胞经接种、扩增后,在生物反应器中生长和表达,直到由于培养基消耗达到极限,细胞密度和活率开始下降。补料批培养发酵中,通过在培养过程中的不同时间点添加补料避免营养耗竭,因此,培养时间比批处理模式更长,最终生产率提高。无论是批培养还是补料批培养,随着培养过程的延长,由于细胞代谢产物会不断累积、渗透压会不断改变等原因,一方面会使生物反应器中细胞密度及活细胞比例在达到一定数量后降低导致目的蛋白产量降低;另一方面由于培养环境的改变,可能导致细胞生长状态的改变,从而会影响产物质量的均一性。灌流培养过程是一种持续向生物反应器添加新鲜培养基,同时通过细胞保留装置截留细胞,持续分离含有目的产物和代谢产物的收获液的培养方式,因此可提供对细胞稳定且有利的生长环境,维持细胞密度和较高、较长的发酵时间^[5]。相较于批培养及补料批培养模式,灌流培养可以在高细胞密度环境下长时间维持稳定培养环境^[6-7]。

在生产规模方面,批培养和补料批培养规模相对固定,若要提高生产规模需要通过新增生产线或新增产地等方式开展。而灌流培养生产规模可以通过 4 个方面进行规模放大:① 在不改变收获液流速和设备情况下变更运行时间。② 在不改变整体运行时间和设备情况下增加收获液流量。③ 增加设备(平行)放大。④ 通过增加设备容量来放大规模。因此相对于批培养和补料批培养,灌流培养的生产当时更加灵活,有助于重组蛋白生物制品生产企业根据供应需求灵活调整规模^[2]。批量培养的操作相对简单,且工业界目前对于批量培养的工艺及工艺控制有较多的实践经验,而灌流培养工艺对于工艺和过程的控制较复杂,且部分依赖于高度自动化的设备。灌流模式有利于工艺规模结合实际需求进行灵活调整,但需要大量的前期研究及验证工作来支持工艺规模的灵活调整。此外,由于灌流生产工艺发酵时间较长,对生产用细胞稳定传代能力有更

高的要求^[5,8]。

2 灌流培养的药学审评考量

2.1 体外细胞传代周期限度

灌流培养工艺的细胞传代周期限度的确定基本原则同批量培养一致,应结合小规模传代稳定性研究和实际生产终末代细胞的研究综合确定。对于小规模细胞传代稳定性研究应该能够体现灌流发酵特点,通常的连续传代培养方法不能体现该工艺特点,可以利用线性缩小的生物反应器模拟实际生产开展连续培养以研究生产过程中的细胞传代稳定性。在细胞传代稳定性研究期间,一方面应确保小规模工艺参数能模拟实际工艺参数;另一方面,因灌流培养通常可维持较长时间的发酵,因此小规模发酵天数应覆盖实际生产的最大天数。在考察项目方面,除常规考察项目外,由于灌流培养不同时间产物质量可能存在一定差异,因此不仅要考察培养结束时产物的质量(纯度、糖基化、活性、杂质)及遗传物质稳定性,还应该取发酵不同时间段的产物进行产物质量及遗传物质稳定性的研究,以更好反映连续灌流培养不同时间点产物特点,为下游合批、分批提供依据。此外,还应对实际发酵的不同过程中间体进行产品质量监测,并对生产终末代细胞进行遗传稳定性确认,并按照药典要求开展生产终末代细胞检定,以进一步结合实际工艺对细胞限传周期的限度进行合理控制。

若采用灌流培养时存在侧传培养,则对于侧传培养细胞的传代稳定性研究中还应结合侧传培养工艺开展侧传培养的细胞传代稳定性研究,应将侧传培养与非侧传培养的细胞及产物进行横向比较,考察侧传培养工艺是否会影响发酵的工艺及产品质量,结合研究结果合理确定侧传培养细胞的培养条件、传代周期限制等。

2.2 生产用原材料

对于灌流培养工艺生产用原材料的控制除应按照药典《生物制品原材料及辅料质量控制》对生产用原材料进行分级控制外,考虑到部分培养基、缓冲液可能需要在配置后长时间放置备用,因此对于放置期间微生物限度、内毒素及原材料质量的变化情况应开展研究和控制,以确保不会因为原材料污染或质量的改变对灌流工艺造成非预期的工艺波动。

2.3 生产工艺

2.3.1 原液工艺规模和批次确定

为了便于批次溯源和工艺控制,应根据工艺情

况明确灌流培养的规模,灌流培养原液的规模可以是相对固定的,也可以定义为一个范围。对于批次方面,起始自同一细胞库的一支或同时复苏多支生产用细胞,经过既定的扩增、发酵后,经单次或多次收获得到的发酵产物,根据供应需求或下游纯化规模,可加工成一批或多批原液。

对于发酵规模的确定方面,几种常见的灌流培养模式的考量如下。

2.3.1.1 生物反应器数量固定,发酵天数固定 这种情况下灌流的放液速度通常是固定的工艺参数范围,因此收获液的总体积相对固定,发酵规模相对固定,在发酵阶段应结合反应器数量、发酵天数,说明每批收获液的规模。

2.3.1.2 生物反应器数量固定,发酵天数不固定 这种情况下要明确生物反应器的数量、产物收获的时间范围,相应地说明收获液的产量范围。

2.3.1.3 生物反应器数量不固定,发酵天数固定 这种情况下,首先要确定发酵的时长和生物反应器的数量范围,其次要关注是否所有生物反应器都是同时进行发酵,对于存在侧传培养的发醉工艺,可能各个生物反应器发醉起始时间不完全相同,要关注所有生物反应器是各自固定发醉时间,还是所有生物反应器在同一时间结束发醉。

2.3.1.4 生物反应器数量不固定,发醉时间不固定 这种情况下相对比较复杂,要确定生物反应器的数量范围和发醉时间的范围,考虑是否存在侧传,应确保各个生物反应器的细胞传代均在限制范围内。

灌流培养的原液生产,在收获和纯化阶段可能存在多步分批、合批操作,为了更加准确表达分批、合批策略,可采用图示的方法对涉及分批、合批的工艺步骤进行说明,并对不同阶段的规模,允许分批、合批的总操作次数进行说明。为了确保产品的可溯源性及产品的批间一致性,应建立良好的物料可追溯性、工艺监测和物料分流策略。有研究表明在培养基、培养条件、起始细胞等相同的情况下,与批量培养工艺相比,灌流培养产品的异质性程度较低,但灌流培养过程中随着生产用细胞胞龄的延长,细胞代谢同样会发生一定程度的改变,进而造成不同胞龄产物的糖基化等翻译后修饰类型和比例、聚体和片段等杂质的相对含量也会发生变化^[5]。对于重组治疗用生物制品而言,质量属性的差异可能对安全性、有效性产生影响,因此在分批、合批的过程中要结合实际监测结果考虑源自不同胞龄来源中间体

合适比例的混批,为了确保混批后产品质量符合后续加工要求,确保工艺的批间一致性能力,可考虑采用合适的质量指标对混批后中间产品进行过程控制,结合工艺能力设置可接受范围。

2.3.2 原液生产工艺

2.3.2.1 工艺参数及过程控制 灌流培养工艺需要维持较长时间的动态稳态培养环境,工艺的稳健性依赖于有效的工艺和过程控制,应基于工艺研究在合适的时间对工艺参数和过程产物的质量属性进行监控。对于灌流工艺的工艺控制分为在线检测和离线检测2种方法,企业可以根据工艺和监控需求选择1种或多种不同的过程检测技术,对发醉过程中的工艺参数及中间产物进行多角度的监测。对于过程控制检测,一方面需考虑方法的时效性;另一方面,对于在线检测方法还应关注检测方法本身是否会增加污染风险。随着技术的发展,越来越多的技术被运用到灌流培养的过程检测中,例如:高效液相色谱和质谱具有高灵敏度和准确性,用于在线检测时,可以识别和定量代谢物、目的蛋白和宿主细胞蛋白质^[8]。

扩增阶段:由于扩增阶段细胞的活率、密度等会影响后续发醉中细胞的生长和生产能力,因此应对扩增阶段进行监测。对于工艺参数及中间产物监测的考量与批培养模式相似。但对于有侧传培养的发醉工艺,为确保侧传培养的细胞在后续增殖及生产过程中生长属性与非侧传培养细胞一致,降低产品质量属性的异质性,应通过充分地研究确定侧传培养细胞的种子细胞来源及侧传培养细胞将接种于哪一步工艺,制定相关工艺参数的控制范围。

发醉阶段:灌流培养工艺中N生物反应器通常是先进行扩增,达到一定稳态后(如达到预设的细胞密度),进入发醉生产。发醉生产后又分为2种不同的情况,部分工艺从进入发醉生产后就开始收获发醉产物,部分工艺在发醉生产一段时间后开展收获发醉产物,因此N阶段的工艺参数应分别说明扩增阶段和发醉阶段的工艺参数。通常认为该阶段的关键工艺参数除关注不同阶段培养基、细胞密度、溶氧量、代谢产物浓度等工艺参数外,对于灌流培养工艺特有的工艺参数包括灌流速率、细胞放流速率、产物放出速率、发醉开始时间等也非常关键,因此建议对相关工艺参数可允许的范围进行充分研究。对于发醉一段时间后开始收获的工艺,还应制定明确、可行的用于判断合格发醉液的监控标准,对于不合

格发酵液的分流应有明确的规定,以防止影响后续产品的加工。

在过程控制方面,鉴于不同胞龄产品质量属性方面可能存在差异,此外工艺参数的波动也可能给产品质量属性带来差异,因此应选取合适的检测频率、取样点及敏感的关键质量属性对发酵过程进行控制,并结合工艺开发及临床试验结果,设置合理的过程控制可接受限度,确保发酵工艺处于受控状态。若有必要,可根据过程监控结果对工艺参数进行调整,以确保目的产物的质量,但调整的范围应有充分的研究数据支持,以防止造成发酵工艺不可控的波动^[2]。对于发酵阶段微生物限度、内毒素、支原体、外源因子等过程控制,若不能做到各个代表性阶段取样检测,至少应在代表最差的条件下来取样,通常认为发酵时间越长污染的可能性越大,可结合实际工艺情况考虑在发酵结束时取样。若同时运行多个发酵罐,为了最大限度地控制污染,可考虑对每个发酵罐的生产终末收获液进行外源因子检测。

收获阶段:对于灌流培养,发酵和收获是并行的,用于灌流培养的收获方式可通过切向流过滤(tangential flow filtration, TFF)和替代切向流过滤(alternating tangential flow filtration, ATF)完成,收获过程中还可能使用超声沉降装置。对于某些双特异性单抗或融合蛋白,收获过程不仅是简单的分离过程,若过程参数设置不合理,可能对产物质量造成影响,例如:较高的剪切力可能造成蛋白片段的增加。因此,需要结合收获方式,确定相关工艺参数的合理控制范围^[8]。对于多个发酵罐并行的灌流发酵工艺,收获阶段可能采取每个发酵罐的产品单独收获、贮藏,也可能多个发酵罐在同一时间段的收获液合并收获。不同收获方式各有利弊,单个发酵罐单独收获有利于产品溯源,多个发酵罐同胞龄的产物合并收获时,同一集液装置中目的蛋白质量的同质性相对较高,应结合下游合批、分批策略选择合适的产物收集方式。由于灌流培养是一种维持时间较长的发酵过程,因此第一批收获物可能要经过一定时间的贮藏,应关注收获产物的贮存容器及贮存条件对目的蛋白质量的影响。

纯化阶段:对于纯化工艺采用非连续纯化工艺的生产,通常灌流培养工艺与批培养或补料批培养的纯化步骤相比,灌流培养因产物较多,第一步层析工艺(通常为亲和层析)需要处理大量的收获液,层析填料循环次数和再生次数通常不一致,要分别对

层析填料或滤膜的循环次数和再生次数开展相应的研究。此外,与补料批培养的工艺步骤相比,灌流培养工艺下游的非连续纯化中,存在较多分批、合批操作,关于纯化过程分批、合批的考量已在上文论述,不再重复论述。

2.3.3 原液生产工艺验证

采用灌流工艺生产的原液工艺验证相对比较复杂,除常规的批次数量的考虑外,为了支持较灵活的生产规模调整模式,可能需要在发酵工艺验证过程中考虑发酵时长是否覆盖了不同培养时长,细胞扩增过程中是否覆盖了侧传培养(如果有侧传培养),是否覆盖了生物反应器的最大和最小运行数量,来源于一瓶细胞和同时来源于多瓶的产物质量是否存在差异,同一发酵罐的不同胞龄产物之间是否存在差异,以及存在差异的质量属性有哪些。在纯化工工艺验证中,对多次分批、合批操作,除了验证合批、分批最大批次及操作外,还应对可能涉及的中间体重复过滤、冻融等情况进行验证,对中间体贮存的稳定性及相容性进行充分评估。验证过程中应通过一系列工艺及过程控制项目证明在不同生产模式下,工艺具有稳健性,通过放行、扩展的质量研究及稳定性研究数据证明产品具有批间一致性。

对于病毒去除/灭活工艺验证,应结合发酵工艺和纯化工工艺最差条件,参考 ICH Q5A 开展验证^[9]。对层析步骤开展病毒去除/灭活工艺验证时,考虑工艺参数代表性、中间样品代表性、层析填料循环及再生次数。

2.4 其他

制剂工艺开始,灌流培养工艺与补料批培养工艺无明显差异,关注点相同。在质量研究和稳定性考察方面,要特别关注代表性原液(如含有侧传培养工艺、中间体反复冻融等)加工成的制剂批次质量和稳定性变化趋势。

3 总结与挑战

商业化的治疗用重组蛋白生物制品生产必须具有批间一致、质量可控、产量满足商业生产的要求,但生物制品在发酵过程中很容易因为环境变化或细胞自身代谢状态的变化造成在细胞内和细胞外的修饰类型及水平等发生变化,从而导致产品的异质性^[1]。灌流培养工艺虽然相对于批次培养工艺能够维持较长时间的发酵时长,但需要大量的前期研究来确定合适的工艺参数来确保动态稳定发酵状态的维持,并对工艺中无菌工艺的维持能力要求较高。

此外,灌流培养对于培养基消耗量较大,也一定程度限制了灌流工艺的发展。灌流培养工艺作为一种连续生产工艺,也是生物制品连续制造中非常重要的一部分,对于生物制品的连续生产,我国在监管方面目前经验较少,未来需要落实或制定相关的法规或技术文件。无论从产业界还是监管层面,对于灌流培养工艺的研究和控制有待进一步积累相关工艺知识。

[参 考 文 献]

- [1] KARST DJ, STEINEBACH F, MORBIDELLI M. Continuous integrated manufacturing of therapeutic proteins[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, 53:76-84.
- [2] ICH. Continuous manufacturing of drug substances and drug products(draft version) [EB/OL]. (2021-07-27) [2022-10-11]. https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q13_Step2_DraftGuideline_%202021_0727.pdf.
- [3] FDA. Quality considerations for continuous manufacturing guidance for industry (draft guidance)[EB/OL]. (2019)[2022-10-11]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/quality-considerations-continuous-manufacturing>.
- [4] FDA. Impact of continuous manufacturing processes on the viral safety of therapeutic proteins [EB/OL]. [2021]. <https://www.fda.gov/drugs/regulatory-science-action/impact-continuous-manufacturing-processes-viral-safety-therapeutic-proteins>.
- [5] BIELSER JM, CHAPPUISA L, XIAO Y, et al. Perfusion cell culture for the production of conjugated recombinant fusion proteins reduces clipping and quality heterogeneity compared to batchmode processes[J]. *J Biotechnol*, 2019,302:26-31.
- [6] BIELSER JM, WOLF M, SOUQUET J, et al. Perfusion mammalian cell culture for recombinant protein manufacturing-a critical review[J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(4):1328-1340.
- [7] 苏爽, 金永杰, 黄瑞晶, 等. 哺乳动物细胞灌流培养工艺研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2019, 39(3): 105-110.
- [8] CHEN C, WONG HE, GOUDAR CT. Upstream process intensification and continuous manufacturing[J]. *Curr Opin Chem Eng*, 2018, 22:191-198.
- [9] ICH. Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin[EB/OL]. (1998) [2022-10-11]. <https://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.

编辑:蒋欣欣/接受日期:2022-11-14