

CZU: 615.357.012:582.282.232(478)

<https://doi.org/10.52692/1857-0011.2022.3-74.30>

PERSPECTIVE DE PRODUCERE A HORMONULUI BIOSIMILAR DE CREȘTERE UMAN RECOMBINAT ÎN REPUBLICA MOLDOVA

Liliana RUSNAC¹, dr. în șt. farm., conferențiar cercetător,

Radu CAZACU¹,

Mihail TODIRAȘ¹, dr. hab. în șt. med., profesor universitar,

Corina SCUTARI², dr. în șt. med., conferențiar universitar,

Vladimir VALICA¹, dr. hab. în șt. farm., profesor universitar,

¹Centrul Științific al Medicamentului din cadrul Universității de Stat de Medicină și Farmacie „N. Testemițanu”,

²Catedra de Farmacologie și Farmacie Clinică din cadrul Universității de Stat de Medicină și Farmacie „N. Testemițanu”

e-mail: liliana.rusnac@usmf.md

Rezumat.

În cadrul colaborării între USMF «N. Testemițanu», întreprinderea farmaceutică Balkan Pharmaceuticals și ICGEB a fost efectuat transferul tehnologic la etapa extrapolării de la faza de laborator la faza pilot a proceselor creării băncii celulelor de lucru și creșterii tulpinilor de *Pichia pastoris* în paharul Erlenmeyer. Pentru obținerea hormonului de creștere recombinat în calitate de sistem de expresie a fost selectat *Pichia pastoris*, care posedă numeroase avantaje comparativ cu alte organisme, inclusiv folding-ul proteinelor, modificările posttranslaționale ale proteinelor și manipularea ușoară. Gena modificată GH1 a somatotropinei umane recombinante a fost introdusă în genomul culturii de *Pichia pastoris* cu ajutorul restrictazelor în apropierea promotorului genei AOX1, în calitate de vector servind plasmidul pPIC9K. Gena GH1 a fost activată de promotorul genei AOX1 care poate fi indus cu ușurință de prezența metanolului în mediul de cultură. Ulterior, la secvența modificată s-a adăugat secvența „Prepro-alpha Factor Leader” de la *Saccharomyces cerevisiae* pentru ca somatotropina obținută să fie secretată în mediul de cultură. În cadrul procesului de transfer tehnologic au fost examinate influența procedeele tehnologice alese asupra unor parametri ale produsului obținut, au fost elaborate Regulamente Tehnologice pentru procesele de stocare pe durată scurtă și pe termen lung al celulelor de *Pichia pastoris* și pentru procesul de preparare a inoculului, inoculare și creștere a tulpinilor de *P. pastoris* cu hormonul de creștere uman recombinat în paharul Erlenmeyer. Au fost elaborate Proceduri Standarte de Operare ale proceselor de creare a băncii celulelor de lucru, determinării activității biologice *in-vitro* a preparatului hormonul de creștere uman recombinat, cu implementarea ulterioară în procesul de producere a biosimilarului rhGH la întreprinderea SC Balkan Pharmaceuticals SRL.

Cuvinte-cheie: hormon biosimilar de creștere uman recombinat, producere farmaceutică autohtonă, transfer tehnologic, *Pichia pastoris*, plasmid pPIC9K.

Summary. Prospects of biosimilar recombinant human growth hormone manufacture in the Republic of Moldova.

In collaboration of SUMPh „N. Testemițanu”, the pharmaceutical company Balkan Pharmaceuticals and ICGEB the technology transfer during scale-up from the laboratory phase to the pilot phase of the processes of creating the working cell bank and growing *Pichia pastoris* strains in the Erlenmeyer flask were carried out. *Pichia pastoris* was selected for recombinant growth hormone as an expression system, which has many advantages over other organisms, including protein folding, post-translational changes in protein, and easy handling. The GH1 altered recombinant human somatotropin gene was introduced into the genome of *Pichia pastoris* culture using restriction near the AOX1 gene promoter as a vector serving the pPIC9K plasmid. The GH1 gene was activated by the AOX1 gene promoter which can be easily induced by the presence of methanol in the culture medium. Subsequently, the „Prepro-alpha Factor Leader” sequence from *Saccharomyces cerevisiae* was added to the modified sequence so that the obtained somatotropin could be secreted into the culture medium. In the technological transfer process the influence of the chosen technological processes on some parameters of the obtained product were examined, Technological Regulations were developed for short and long term storage processes of *Pichia pastoris* cells and for the process of inoculum preparation, inoculation and growth of *P. pastoris* strains with recombinant human growth hormone in the Erlenmeyer flask. Standard Operating Procedures were developed for the processes of creating the working cell bank, determining the *in-vitro* biological activity of the recombinant human growth hormone preparation, with subsequent implementation in the process of producing rhGH biosimilar at CS Balkan Pharmaceuticals Ltd.

Keywords: biosimilar recombinant human growth hormone, domestic pharmaceutical manufacture, technology transfer, *Pichia pastoris*, pPIC9K plasmid.

Резюме. Перспективы производства биоаналогов рекомбинантного человеческого гормона роста в Республике Молдова.

В сотрудничестве с ГМФУ «Н.Тестемицану», фармацевтической компанией Balkan Pharmaceuticals и ICGEB был проведен технологический трансфер на этапе масштабирования от лабораторной фазы к пилотной фазе про-

цессов создания рабочего банка клеток и выращивания штаммов *Pichia pastoris* в колбах Эрленмейера. В качестве системы экспрессии для рекомбинантного гормона роста была выбрана *Pichia pastoris*, имеющая ряд преимуществ по сравнению с другими организмами, включая укладку белка, посттрансляционные изменения в белке и простоту в обращении. Измененный GH1 рекомбинантный ген соматропина человека вводили в геном культуры *Pichia pastoris* с помощью рестрикции вблизи промотора гена AOX1 в качестве вектора, использовали плазмид pPIC9K. Ген GH1 был активирован промотором гена AOX1, который можно легко индуцировать посредством присутствия метанола в культуральной среде. Затем к модифицированной последовательности добавляли последовательность «препро-альфа-лидер фактора» из *Saccharomyces cerevisiae*, чтобы полученный соматропин мог секретироваться в культуральную среду. В процессе технологического трансфера изучено влияние выбранных технологических процессов на некоторые параметры получаемого продукта, разработаны Технологические Регламенты для процесса кратковременного и длительного хранения клеток *Pichia pastoris* и для процесса приготовления инокулята, инокуляции и выращивания *P. pastoris* с рекомбинантным гормоном роста человека в колбе Эрленмейера. Разработаны Стандартные Операционные Процедуры для процессов создания рабочего банка клеток, определения биологической активности препарата рекомбинантного гормона роста человека *in vitro* с последующим внедрением в процесс производства биоаналога rhGH на предприятии Balkan Pharmaceuticals ООО.

Ключевые слова: биоаналог рекомбинантного гормона роста человека, отечественное фармацевтическое производство, трансфер технологий, *Pichia pastoris*, pPIC9K плазмид.

Introducere.

Augmentarea gradului de conștientizare privind eficiența hormonului de creștere, cererea de terapii cu hormon de creștere eficiente din punct de vedere al costurilor; sporirea prevalenței bolilor cronice grave, cum ar fi bolile renale cronice și retardul de creștere și disfuncțiile hipofizare; și intensificarea conformității pentru formulările de hormon de creștere sunt principalii factori ce determină extinderea pieței globale a acestuia. Utilizarea produselor biosimilare constituie o alternativă superioară medicamentului de sinteză chimică, anume grație faptului că medicamentele biologice conțin substanțe active provenite din sursă biologică, de exemplu din celule sau organisme vii și sunt mult mai apropiate organismului viu, și respectiv posedă o eficiență și inofensivitate sporită. Menținerea unei linii celulare în cultură continuă sau extinsă prezintă în sine o practică cu multe puncte slabe printre care se numără: riscul de contaminare microbiană; pierderea caracteristicilor de interes (de exemplu, expresia antigenului de suprafață sau a anticorpilor monoclonali); deriva genetică, în special în celulele cunoscute ca având un cariotip instabil; pierderea liniei celulare din cauza depășirii duratei de viață finite; risc de contaminare încrucișată cu alte linii celulare.

Toate aceste riscuri sunt minimizate sau excluse prin utilizarea băncii celulelor de lucru (BCL). Implementarea BCL asigură: calitate constantă a materialului, efectuarea experimentelor folosind culturi din același interval de numere de trecere, prezența celulelor în cultură numai atunci când este necesar, păstrarea caracteristicilor liniei celulare originale. Utilizarea BCL reduce, de asemenea, costul proceselor de cultură celulară, oferind o alternativă rentabilă pentru păstrarea constantă a celulelor în cultură. De asemenea, este redusă în mod eficient frecvența eșantioanelor de celule care se diversifică de la diviziunile celulare naturale în timp.

Actualmente pe piața Republicii Moldova este autorizat un singur produs medicamentos din grupul hormonilor lobului hipofizar anterior și analogi, anume Saizen®, pulbere pentru soluție injectabilă, 8 mg, deținător de certificat de înregistrare Ares Trading S.A., Elveția, producător Merck Serono S.P.A., Italia. Astfel putem spune, că piața farmaceutică autohtonă nu se confruntă cu fenomenul de concurență la capitolul produse medicamentoase din grupul ATC H01AC01. Dat fiind că terapia cu hormonul de creștere uman recombinant rhGH are de regulă o durată recomandată de câțiva ani și un regim de dozare individualizat cu un calcul al dozei bazat pe greutatea corporală a pacientului o problemă prioritară este creșterea aderenței și compliancei la tratament a pacienților. Avantajul oferit sistemului național de sănătate de concurența dintre medicamentele biosimilare constă în îmbunătățirea accesului pacienților la medicamente biologice sigure și eficiente, de o calitate dovedită și preț mai mic. Producătorul de medicamente autohton Balkan Pharmaceuticals SRL și-a propus fabricarea primului biosimilar din Republica Moldova – un scop exhaustiv în sine, precum și producția internă fără precedent a hormonului de creștere uman recombinant (rhGH). Acest fapt asigură explorarea empirică a celui mai promițător segment al industriei farmaceutice globale cu cea mai rapidă rată a creșterii. Per se domeniul biosimilarelor este unul eminamente nemărginit pentru diverse cercetări științifice locale și internaționale în diapazonul imens al disciplinelor de medicină și farmacie.

Materiale și metode.

Pentru obținerea hormonului de creștere recombinat a fost selectat în calitate de sisteme de expresie *Pichia pastoris*, care are multe avantaje în comparație cu alte organisme. Printre ele putem enumera prelucrarea, folding-ul proteinelor și modifică-

rile posttranslaționale ale proteinelor, dar în același timp, acest organism este la fel de ușor de manipulat ca *E. coli*. *Pichia pastoris* este o drojdie metilotrofă, capabilă să metabolizeze metanolul ca singura sursă de carbon. Primul pas în metabolizarea metanolului este oxidarea lui cu formarea de formaldehidă folosind oxigen molecular. Enzima care catalizează această reacție este alcool oxidază. Pe lângă formaldehidă, această reacție generează peroxid de hidrogen și din acest motiv reacția are loc în peroxizomi pentru a proteja celula de efectul toxic a peroxidului de hidrogen. În același timp alcool oxidaza are o afinitate slabă pentru O₂, iar *Pichia pastoris* compensează aceasta prin expresia mărită a acestei enzime. Promotorul care reglează producția de alcool oxidaza este unul din cei mai utilizați pentru producția proteinelor recombinante. La *Pichia pastoris* alcool oxidaza este codificată de două gene AOX1 și AOX2. Deși similitudinile dintre aceste gene este de 97%, se știe că drojdiile care au doar gena AOX2 activă cresc foarte încet. Ele sunt cunoscute ca tulpine Muts. Produsul genei AOX1 reprezintă cea mai mare parte a alcool oxidazei din celulă. Expresia genei AOX1 este strict reglată și indusă de metanol ajungând la niveluri foarte ridicate (până la 30% din proteina totală solubilă).

În dependență de necesități, *Pichia pastoris* poate expresa proteina de interes atât intracelular cât și extracelular în forma secretată. Secreția necesită prezența unei secvențe semnal pe proteină expresată. În acest context, *Pichia pastoris* are un avantaj major fiind folosită în calitate de sisteme de expresie prin aceea că ea secretă niveluri foarte scăzute de proteine native, ceea ce înseamnă că în mediul de cultură în mare parte se va afla proteina recombinată. Tipul vectorilor utilizați are influențe asupra locului de concentrare a proteinelor. Dacă dorim să avem o expresie intracelulară vom utiliza vectorii pHIL-D2 și pPIC3.5, iar dacă una extracelulară – vectorii pHIL-S1 și pPIC9. În procesul de cultivare a materiei prime pe bază de *Pichia pastoris* cu expresia hormonului de creștere, gena somatropinei umane recombinantă a fost introdusă în genomul culturii de *Pichia pastoris*. În calitate de vector a servit plasmidul pPIC9K care este predistinat pentru proteine secretate în interiorul căruia a fost introdusă gena somatropinei.

În organismul uman somatropina este codificată de către gena GH1, localizată pe cromozomul 17 și are 5 exoni. Pentru a fi introdusă în vectorul selectat (pPIC9K), gena GH1 a fost modificată. În primul rând au fost eliminați intronii, fiind păstrată doar secvența codificatoare. Mai apoi au fost înlocuiți unii codoni cu cei care sunt mai des utilizați de către *Pichia pastoris*, astfel încât să nu se modifice secvența de aminoacizi a somotropinei umane. În continuare, la secvența mo-

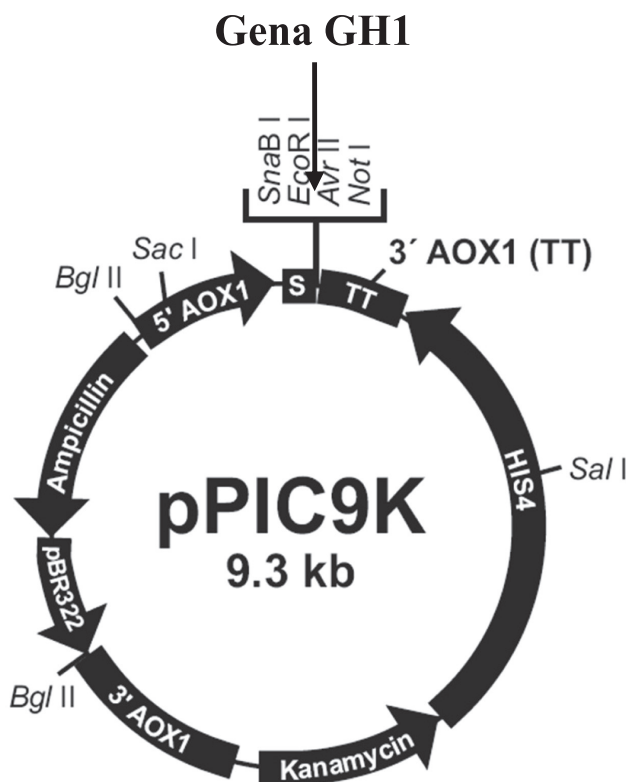


Figura 1. Reprezentarea grafică a vectorului pPIC9K cu gena GH1 înserată.

dificată s-a adăugat secvența "Prepro-alpha Factor Leader" de la *S. cerevisiae* pentru ca somatropina obținută să fie secretată în mediul de cultură. Secvența de ADN ce conține gena GH1 modificată a fost introdusă în vector cu ajutorul restrictazelor în apropierea de promotorul genei AOX1 (fig.1). În acest fel gena GH1 va fi activată de promotorul genei AOX1 care poate fi indus cu ușurință de prezența metanolului în mediul de cultură.

Rezultate.

Conform Regulelor de Buna practică în Producere, transferul tehnologic în procesul de extrapolare (scale-up) de la faza de laborator la faza pilot permite trecerea ușoară și fără grijă a unui produs creat de serviciul de cercetare la faza de microproducție în cadrul întreprinderii producătoare de medicamente și ulterior la faza de producere a seriilor comerciale. În cadrul întreprinderii Balkan Pharmaceuticals SRL, Republica Moldova în procesul de scale-up de la faza de laborator la faza pilot de producere a fost elaborată banca celulelor de lucru a culturii de *Pichia pastoris* pentru stocare de durată scurtă și lungă, a fost preparat inocul și crescută în paharul Erlenmeyer cultura *Pichia pastoris* cu expresia hormonului de creștere uman, care constituie o etapă incipientă indispensabilă producerii industriale a hormonului biosimilar. Pe piața autohtonă crearea băncii celulelor de lucru a unui hormon biosimilar are loc în premieră. Procedura Standart de Operare „Crearea BCL” a stabilit pro-

cedura și principiile necesare pentru formarea băncii de celule de *Pichia pastoris* cu hormonul de creștere uman în cadrul laboratorului de microbiologie al întreprinderii producătoare SC Balkan Pharmaceuticals SRL. Au fost stabilite echipamentele, materialele, reactivile și mediile necesare creării băncii de celule și au fost stipulate etapele, condițiile, durata, compoziția mediului de cultură etc. necesare procesului de însămânțare a tulpinilor de *P.pastoris*. Regulamentele Tehnologice ale proceselor de stocare pe termen scurt și lung a tulpinilor de *Pichia pastoris* cu expresia hormonului de creștere uman recombinat au fost elaborate cu scopul de a stabili pașii și principiile necesare pentru stocarea pe termen scurt și lung a tulpinilor de *P. pastoris* în cadrul laboratorului de microbiologie al întreprinderii producătoare SC Balkan Pharmaceuticals SRL. Au fost stabilite echipamentele, materialele, reactivile și mediile necesare executării etapei de stocare, precum și modul de lucru, inclusiv procesul de pregătire, igienizare și dotare a încăperii; pregătirea și deschiderea mediilor, reactivelor, materialelor necesare. Procedura Standart de Operare elaborată Bioassay – Activitatea biologică a preparatului hormonul de creștere uman recombinat, își propune ca scop stabilirea unei proceduri pentru determinarea activității biologice a hormonului de creștere recombinant uman prin biotestare *in-vitro*, care ține de controlul calității produsului finit solicitată de Farmacopeea Europeană (Monografia Somatropin 0951), această testare urmând să fie realizată în cadrul laboratorului de microbiologie al întreprinderii producătoare SC Balkan Pharmaceuticals SRL. Regulamentul Tehnologic al procesului de pregătire, inoculare și creștere a tulpinilor de *Pichia pastoris* în paharul Erlenmeyer a stabilit etapele procedurii, procesul de pregătire a mediilor, reactivelor, materialelor necesare, metodologia și condițiile de testare, termenul de valabilitate a mediilor utilizate.

Discuții și concluzii.

În cadrul ICGEB (Centrul internațional pentru inginerie genetică și biotehnologie), Trieste, Italia a fost obținut prin fermentare un număr de proteine recombinante farmaceutic active printre care și hormonul de creștere uman. Ulterior, în procesul colaborării între USMF „N.Testemițanu”, întreprinderea farmaceutică Balkan Pharmaceuticals și ICGEB au fost efectuate lucrări de transfer tehnologic a primelor etape de obținere a biomasei de *Pichia pastoris* în cadrul producătorului autohton.

În procesul de pregătire a coloniilor de *P.pastoris* pentru stocare pe termen scurt și lung se utilizează YPg agar cu adaos de geneticin, G418 turnat în plăci Petri sau eprubete (în cazul stocării pe termen scurt)

și în YPg bullion în paharul Erlenmeyer (în cazul stocării pe termen lung). Protocolul elaborat stipulează etapele, condițiile, durata de incubare și durata de stocare cu concretizarea condițiilor de temperatură optimă pentru procesul de stocare a tulpinilor de *P.pastoris* pe termen scurt timp de 2-4 zile la 30°C sau câteva săptămâni sau luni la temperatura 4°C. În cazul stocării pe termen lung criovasele se congelează și se pastrează în azot lichid sau la -80°C, la maximum 2 ani BCL se reinnoiește. Analiza *in-vitro* a rhGH urmează să utilizeze o linie celulară limfom adecvată, Nb2-11, a căror proliferare depinde de lactogeni de mamifere, iar creșterea celulelor și densitatea în prezența rhGH este măsurată cu ajutorul unui colorant fluorescent sau a unei citiri vizibile cu colorant MTT sau colorant MTS. Au fost stabilite echipamentele, materialele, reactivile și mediile necesare determinării activității biologice a hormonului de creștere recombinat uman. Au fost stabilite etapele testării și metodologia testării, descrisă identificarea prin metoda cu MTS și MTT. A fost prezentată citirea și aprecierea rezultatelor în conformitate cu cerințele Farmacopeei Europene. Astfel, potența estimată a rhGH trebuie să fie cuprinsă în limitele > 80% și <125% din potența declarată. Limitele de încredere ($p = 0,95$) ale potenței estimate trebuie să fie incluse în limitele 64% - 156% din potența declarată. Procesul de pregătire, inoculare și creștere a tulpinilor de *Pichia pastoris* cu rhGH în paharul Erlenmeyer urmează să parcurgă următoarele etape de testare: i) dezghețarea coloniilor de *P. pastoris* din BCL, ii) prepararea mediului de creștere a coloniilor microorganismului, iii) primul proces de inoculare a coloniilor în paharul Erlenmeyer cu capacitatea 500ml pe mediu YPg timp de 24-26 ore, iv) al doilea proces de inoculare a coloniilor de *P. pastoris*, obținute la etapa precedentă în paharul Erlenmeyer cu capacitatea de 4l pe mediu YPg timp de 20 ore, v) determinarea densității optice la 600nm. Pentru fiecare etapă a fost elaborată metodologia și condițiile de testare, a fost stabilit termenul de valabilitate a mediului utilizat. În procesul transferului tehnologic la etapa de scale-up a creării băncii celulelor de lucru și creșterii tulpinilor de *Pichia pastoris* în paharul Erlenmeyer au fost observate influența procedeele tehnologice alese asupra unor parametri ale produsului obținut, au fost elaborate Regulamente Tehnologice și Proceduri Operaționale Standart.

În Moldova nu există un precedent în producția de biosimilare. Dimensiunea pieței globale a rhGH este estimată la 2.840,70 milioane USD în 2018 și se așteaptă să ajungă la 5.563,60 milioane USD până în 2026, înregistrând o rată anuală compusă de creștere (CAGR) de 8,6% din 2019 până în 2026. În Moldova anual se desfășoară licitația publică centralizată

cu obiectul achiziționării medicamentelor pentru tratarea pacienților cu insuficiență hipofizară/nanism hipofizar. Pentru perioada bugetară 2021 în scopul realizării Programului Național «Combaterea maladiilor rare» autoritatea contractantă Centrul pentru achiziții publice centralizate în sănătate a lansat invitația de prezentare a ofertelor pentru Somatropinum 1.33 mg / 3.33 mg / 8 mg / 10 mg în cantitate de 21827,00 bucăți de către operatorii economici interesați. Volumul estimativ al producției bazat pe inovație care va fi comercializat pe piața internă va fi calculat reieșind, în primul rând, din cantitatea solicitată în licitația publică pentru a acoperi toate cerințele sau așa numitul “consumul intern” al țării, atingând 100% în materie de coeficient de autoaprovizionare. Volumul estimativ al producției bazat pe inovație care va fi comercializat pe piața externă se va axa pe cererea piețelor CSI și UE la momentul respectiv.

Articolul a fost elaborat în cadrul proiectului cu cifrul 20.80009.8007.14, ”Program de Stat 2020-2023”

Bibliografie.

1. Ascacio-Martinez J. A., Barrera-Saldana H. A. *Production and secretion of biologically active recombinant canine growth hormone by Pichia pastoris*. Gene, 2004; 340(2):261-6.
2. Azadi S., Mahboubi A., Naghdi N., Solaimanian R., Alireza S. *Evaluation of Sorbitol-Methanol Co-Feeding Strategy on Production of Recombinant Human Growth Hormone in Pichia Pastoris*. Iran. J. Pharm. Res., 2017; 16(4):1555-1564.
3. Covic A., Kuhlmann M. *Biosimilars: recent developments*. Int. Urol. Nephrol., 2007; 39(1):261-6.
4. Li E., Abbas R., Jacobs I., Yin D. *Considerations in the early development of biosimilar products*. Drug. Discov. Today, 2015; 20(2):1-9.
5. Murasugi A. *Secretory Expression of Human Protein in the Yeast Pichia pastoris by Controlled Fermentor Culture*. Recent Pat. Biotechnol., 2010; 4(2):153-66.
6. Saenger P. *Ten years of biosimilar recombinant human growth hormone in Europe*. Drug Des. Devel. Ther., 2017; 11:1505-1507.
7. Webster Ch., Wong A., Woollett G. *An Efficient Development Paradigm for Biosimilars*. BioDrugs, 2019; 33(6):603-11.