

Сравнение требований фармакопей мира к качеству клеточных линий

М. А. Водякова, А. Р. Сайфутдинова, Е. В. Мельникова*, Ю. В. Олефир

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Клеточная линия является одним из обязательных компонентов биомедицинского клеточного продукта (БМКП), в составе которого могут быть исключительно жизнеспособные клетки человека. Также клеточные линии (в том числе клетки животных, насекомых, бактерий) могут являться субстратом получения некоторых биологических лекарственных препаратов. Перечень показателей качества и методов контроля качества лекарственных средств в России регламентирован Государственной фармакопеей, содержащей лишь несколько общих фармакопейных статей для препаратов крови или требования к клеточным линиям как к субстратам получения биологических лекарственных препаратов (т. е. предназначена для клеток всех видов). В Российской Федерации в настоящее время отсутствует нормативный документ (аналог Государственной фармакопеи), определяющий требования и методики определения качества БМКП. Таким образом, одной из проблем оценки качества БМКП как при разработке, так и в ходе проведения экспертизы качества при государственной регистрации является отсутствие нормативного документа, определяющего требования к показателям и методикам оценки качества БМКП. Однако для оценки качества (как клеточных линий, так и неклеточных компонентов) могут быть использованы некоторые общие фармакопейные статьи фармакопей России и других стран. Цель работы — изучение и сравнение требований фармакопей мира к качеству клеточных линий, входящих в состав препаратов на основе клеток и тканей человека (аналогов БМКП), которые могут быть использованы в ходе экспертизы качества БМКП. В статье рассмотрены общие фармакопейные статьи (ОФС) фармакопей США, Европейского союза (ЕС), Японии и Республики Беларусь, включая ОФС для биологических/биотехнологических лекарственных препаратов, поскольку их общие требования распространяются и на клеточные линии человека, входящие в состав аналогов БМКП. Рассмотренные подходы и методы оценки качества препаратов на основе клеток и тканей, содержащиеся в ОФС фармакопей США и ЕС, могут служить основой для разработки ОФС в России, например для определения подлинности, активности, вирусной безопасности и митохондриальной ДНК в клеточных линиях БМКП методами, основанными на амплификации нуклеиновых кислот.

Ключевые слова: клеточная линия; биомедицинский клеточный продукт; экспертиза качества; Государственная фармакопея Российской Федерации; общая фармакопейная статья; показатели качества; методы контроля качества

Для цитирования: Водякова МА, Сайфутдинова АР, Мельникова ЕВ, Олефир ЮВ. Сравнение требований фармакопей мира к качеству клеточных линий. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(3):159–173. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-159-173>

Контактное лицо: Мельникова Екатерина Валерьевна; melnikovaev@expmed.ru

Comparison of the World Pharmacopoeias' Requirements for the Quality of Cell Lines

M. A. Vodyakova, A. R. Sayfutdinova, E. V. Melnikova*, Yu. V. Olefir

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

The cell line is one of the necessary components of a biomedical cell product (BMCP) which can include only viable human cells. In addition, human, animal, insect, or bacterial cell lines can be used as a substrate for the production of some biological drugs. The list of quality parameters and test methods for medicinal products quality control are specified in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, but it contains only a few general monographs on blood products and a few requirements for cell lines as substrates for the production of biological drugs (which cover all types of cells). Currently, there is no regulatory document comparable to the State Pharmacopoeia of the Russian Federation that would contain requirements and test methods for BMCP quality control in the Russian Federation. Thus, one of the issues that arises both during quality control and approval of BMCPs is the lack of a regulatory document defining requirements for BMCP quality parameters and test methods. However, some general monographs of the Russian Pharmacopoeia and other pharmacopoeias can be used for quality control of both cell lines and non-cellular components. The aim of the study was to analyse and compare different pharmacopoeial requirements for the quality of cell lines used as components in human cell- and tissue-based products (comparable to BMCPs), which could be used in BMCP quality control. The paper analyses general monographs of the United States Pharmacopoeia (USP), European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), Japanese Pharmacopoeia, Pharmacopoeia of the Republic of Belarus, including general monographs on biological/biotechnological products, because their requirements apply to human cell lines included as

components in products similar to BMCPs. The analysed approaches and methods of quality control of cell- and tissue-based products described in the USP and Ph. Eur. could form the basis for elaboration of general monographs for the Russian Pharmacopoeia, including identification, potency, viral safety, and mycoplasma tests that are based on the nucleic acid amplification technology and other tests for cell lines as components of BMCPs.

Key words: cell line; biomedical cell product; quality control; Russian State Pharmacopoeia; general monograph; quality parameters; quality control methods

For citation: Vodyakova MA, Sayfutdinova AR, Melnikova EV, Olefir YuV. Comparison of the world pharmacopoeias' requirements for the quality of cell lines. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2020;20(3):159–173. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-159-173>

Corresponding author: Ekaterina V. Melnikova; melnikovaev@expmed.ru

Одним из критических этапов биомедицинской экспертизы биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) согласно Федеральному закону № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» (180-ФЗ)¹ является экспертиза качества. Правила ее проведения описаны в приказах Минздрава России № 30н² и № 195н³ (для БМКП со сроком хранения/применения менее 15 суток). Показатели качества, по которым будет проводиться экспертиза качества БМКП, определены в приказе Минздрава России № 14н⁴.

В России перечень показателей и проведение методов контроля качества регламентированы Государственной фармакопеей XIV издания (ГФ РФ XIV)⁵, которая включает общие фармакопейные статьи (ОФС) и частные фармакопейные статьи (ФС), согласно Федеральному закону № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (61-ФЗ)⁶ предназначенные только для лекарственных средств (ЛС).

В Российской Федерации в настоящее время отсутствует нормативный документ (аналог ГФ РФ XIV), определяющий требования и методики оценки качества БМКП (аналогов ОФС, ФС), в соответствии с которым должна осуществляться экспертиза качества. Учитывая, что БМКП может состоять из нескольких компонентов, одним из которых обязательно будет являться клеточная линия (КЛ) человека, некоторые ОФС ГФ РФ XIV могут быть использованы для оценки качества КЛ, входящих в БМКП. Кроме того, не запрещено следовать рекомендациям фармакопей Европейского союза (ЕС)⁷, США⁸ и других фармакопей, касающихся оценки качества препаратов на основе клеток и тканей человека (аналогов БМКП). Также разработчиками (заявителями) могут быть предложены с соответствующим обоснованием другие методы и методики контроля качества при наличии их валидации.

Цель работы — изучение и сравнение требований фармакопей мира к качеству клеточных линий, входящих в состав препаратов на основе клеток и тканей человека (аналогов БМКП), которые могут быть использованы в ходе экспертизы качества БМКП.

В рамках поставленной цели были рассмотрены ОФС из различных зарубежных фармакопей, которые могут быть использованы для оценки качества КЛ, включая ОФС для биоло-

гических/биотехнологических продуктов, поскольку их общие требования к КЛ распространяются и на КЛ человека, входящие в состав препаратов на основе клеток и тканей человека (аналогов БМКП).

Для сравнения требований к качеству КЛ были проанализированы тексты пяти фармакопей:

1. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ XIV);
2. Фармакопея США 42—Национальный формуляр 37 (ФСША 42-НФ 37) (the United States Pharmacopoeia 42 and the National Formulary 37, USP 42-NF 37);
3. Европейская фармакопея 10 издания (ЕФ 10.0) (European Pharmacopoeia 10th ed., Ph. Eur. 10.0);
4. Государственная фармакопея Республики Беларусь II издания (ГФ РБ II)⁹;
5. Фармакопея Японии XVII издания (ЯФ XVII) (The Japanese Pharmacopoeia XVII, JP 17)¹⁰.

Все ОФС, относящиеся к работе с КЛ, были сгруппированы по показателям, которые могут применяться при экспертизе качества БМКП (табл. 1).

В законодательстве США, стран ЕС, РБ и Японии препараты для генной терапии (как *in vivo*, так и *ex vivo*) определяются как биологические лекарственные препараты. В законодательстве Российской Федерации препараты для генной терапии *in vivo* и *ex vivo* регулируются разными Федеральными законами. Первые, согласно Федеральному закону № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности»¹¹, называются генотерапевтическими и относятся к биологическим (их обращение на территории России регулируется 61-ФЗ), а вторые — к БМКП (180-ФЗ). Таким образом, в рассмотрение были включены ОФС, содержащие требования зарубежных фармакопей к препаратам генной терапии и к КЛ, входящим в их состав (в случае генной терапии *ex vivo*).

Также следует отметить, что некоторые ОФС фармакопей США, ЕС и Японии гармонизированы, а фармакопея РБ полностью разработана на основе Европейской фармакопей с предоставленного разрешения Европейского директората по контролю качества лекарственных средств и здравоохранению Совета

¹ Федеральный закон Российской Федерации от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

² Приказ Минздрава России от 31.01.2017 № 30н «Об утверждении Правил проведения биомедицинской экспертизы биомедицинских клеточных продуктов и форм заключений комиссии экспертов федерального государственного бюджетного учреждения по проведению биомедицинской экспертизы биомедицинских клеточных продуктов».

³ Приказ Минздрава России от 28.04.2017 № 195н «Об утверждении Порядка проведения экспертизы качества биомедицинского клеточного продукта в месте производства биомедицинского клеточного продукта с использованием оборудования производителя».

⁴ Приказ Минздрава России от 19.01.2017 № 14н «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт».

⁵ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

⁶ Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

⁷ European Pharmacopoeia 10th ed.; 2020.

⁸ USP 42–NF 37; 2019.

⁹ Государственная фармакопея Республики Беларусь. II изд.; 2012.

¹⁰ Japanese Pharmacopoeia 17th ed.; 2016.

¹¹ Федеральный закон Российской Федерации от 05.07.1996 № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности».

Таблица 1. Сравнительный перечень общих фармакопейных статей
Table 1. Comparative list of general monographs

Показатель качества Quality parameter	Общие фармакопейные статьи различных фармакопей General monographs included in different pharmacopoeias				
	ГФ РФ XIV Ph. Rus. 14	ФСША 42-НФ 37 USP 42-NF 37	ЕФ 10.0 Ph. Eur. 10.0	ГФ РБ II Ph. Bel. 2	ЯФ XVII JP 17
Общие требования к качеству, терминология General quality requirements, terminology	ОФС 1.7.2.0011.15 Требования к клеточным культурам — субстратам производства биологических лекарственных препаратов OFS 1.7.2.0011.15 Requirements for cell cultures used as substrates for the production of biological products	<1046> Cellular and Tissue-Based Products <1047> Gene Therapy Products	5.2.1 Terminology used in monographs on biological products 5.2.3 Cell substrates for the production of vaccines for human use 5.14 Gene transfer medicinal products for human use	5.2.1 Общепринятая терминология в статьях на биологические продукты 5.2.3 Клетки-продуценты для производства вакцин для медицинского применения 5.14 Лекарственные средства для генной терапии для медицинского применения 5.2.1 Terminology used in monographs on biological products 5.2.3 Cells for the production of vaccines for human use 5.14 Gene transfer medicinal products for human use	—
Стерильность Sterility	ОФС 1.2.4.0002.18 Микробиологическая чистота ОФС 1.2.4.0003.15 Стерильность Проект ОФС Микробиологический контроль биомедицинских клеточных продуктов OFS 1.2.4.0002.18 Microbiological quality OFS 1.2.4.0003.15 Sterility Draft monograph Microbiological control of biomedical cell products	61 Microbiological Examination of Nonsterile Products: Microbial Enumeration Tests 62 Microbiological Examination of Nonsterile Products: Tests for Specified Microorganisms 71 Sterility Tests <1071> Rapid Microbial Tests for Release of Sterile Short-Life Products: a Risk-Based Approach	2.6.1 Sterility 2.6.12 Microbiological examination of nonsterile products: microbial enumeration tests 2.6.13 Microbiological examination of nonsterile products: tests for specified microorganisms 2.6.27 Microbiological examination of cell-based preparations 5.1.6 Alternative methods for control of microbiological quality	2.6.1 Стерильность 2.6.12 Микробиологические испытания нестерильной продукции: суммарное количество жизнеспособных азобов 2.6.13 Микробиологические испытания нестерильной продукции: испытания на наличие специфических микроорганизмов 2.6.27 Микробиологический контроль клеточных продуктов 5.1.6 Альтернативные методы контроля микробиологической чистоты 2.6.1 Sterility 2.6.12 Microbiological examination of nonsterile products: total viable count 2.6.13 Microbiological examination of nonsterile products: tests for specified microorganisms 2.6.27 Microbiological examination of cell-based preparations 5.1.6 Alternative methods for control of microbiological quality	4.05 Microbiological Examination of Nonsterile Products 4.06 Sterility Test G4 Rapid Microbial Methods
Микоплазмы Mycoplasmas	ОФС 1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм OFS 1.7.2.0031.15 Mycoplasma Tests	63 Mycoplasma Tests	2.6.7 Mycoplasmas	2.6.7 Микоплазма 2.6.7 Mycoplasmas	G3 Mycoplasma Testing for Cell Substrates used for the Production of Biotechnological/Biological Products

Продолжение табл. 1
 Table 1 (continued)

Общие фармакопейные статьи различных фармакопей General monographs included in different pharmacopoeias					
Показатель качества параметер	ГФ РФ XIV Ph. Rus. 14	ФСША 42-НФ 37 USP 42-NF 37	ЕФ 10.0 Ph. Eur. 10.0	ГФ РБ II Ph. Bel. 2	ЯФ XVII JP 17
Бактериальные эндотоксины Bacterial Endotoxins	<p>ОФС 1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины OFS 1.2.4.0006.15 Bacterial Endotoxins</p> <p>ОФС 1.1.0024.18 Уменьшение риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных при применении лекарственных средств OFS 1.2.4.0005.15 Пирогенность ОФС 1.2.4.0015.18 Вирусная безопасность ОФС 1.7.2.0013.15 Полимеразная цепная реакция ОФС 1.7.2.0022.15 Определение подлинности и чистоты биологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот ОФС 1.7.2.0033.15 Метод иммуноферментного анализа Проект ОФС Определение остаточной ДНК OFS 1.1.0024.18 Minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via medicinal products OFS 1.2.4.0005.15 Pyrogenicity OFS 1.2.4.0015.18 Viral safety OFS 1.7.2.0013.15 Polymerase chain reaction OFS 1.7.2.0022.15 Identification and control of purity of biological products by Western blotting OFS 1.7.2.0033.15 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Draft monograph Determination of residual DNA</p>	<p>85 Bacterial Endotoxins Test</p> <p>151 Pyrogen Test <1043> Ancillary Materials for Cell, Gene, and Tissue-Engineered Products <1044> Cryopreservation of Cells <1050> Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin <1102> Immunological Test Methods—General Considerations <1103> Immunological Test Methods—Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) <1104> Immunological Test Methods—Immunoblot Analysis <1125> Nucleic Acid-Based Techniques—General <1126> Nucleic Acid-Based Techniques—Extraction, Detection, and Sequencing <1127> Nucleic Acid-Based Techniques—Amplification <1128> Nucleic Acid-Based Techniques—Microarray <1129> Nucleic Acid-Based Techniques—Genotyping <1130> Nucleic Acid-Based Techniques—Approaches for Detecting Trace Nucleic Acids (Residual DNA Testing) <1237> Virology Test Methods</p>	<p>2.6.14 Bacterial Endotoxins</p> <p>2.6.8 Pyrogens 2.6.21 Nucleic acid amplification techniques 2.7.1 Immunochemical methods 5.1.7 Viral safety 5.2.8 Minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products 5.2.12 Raw materials of biological origin for the production of cell-based and gene therapy medicinal products</p>	<p>2.6.14 Бактериальные эндотоксины 2.6.14 Bacterial Endotoxins</p> <p>2.6.8 Пирогенность 2.6.21 Методы амплификации нуклеиновых кислот 2.7.1 Иммунохимические методы 5.1.7 Вирусная безопасность 5.2.8 Снижение риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных при применении медицинских лекарственных средств 2.6.8 Pyrogens 2.6.21 Nucleic acid amplification techniques 2.7.1 Immunochemical methods 5.1.7 Viral safety 5.2.8 Minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human medicinal products</p>	<p>4.01 Bacterial Endotoxins Test G4 Decision of Limit for Bacterial Endotoxins</p> <p>4.04 Pyrogen Test G3 Basic Requirements for Viral Safety of Biotechnological/Biological Products listed in Japanese Pharmacopoeia G3 Qualification of Animals as Origin of Animal-derived Medicinal Products provided in the General Notices of Japanese Pharmacopoeia and Other Standards G3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</p>

Продолжение табл. 1
Table 1 (continued)

Общие фармакопейные статьи различных фармакопей General monographs included in different pharmacopoeias					
Показатель качества Quality parameter	ГФ РФ XIV Ph. Rus. 14	ФСША 42-НФ 37 USP 42-NF 37	ЕФ 10.0 Ph. Eur. 10.0	ГФ РБ II Ph. Bel. 2	ЯФ XVII JP 17
Подлинность, активность Identification, potency	ОФС 1.7.2.0013.15 Полимеразная цепная реакция ОФС 1.7.2.0022.15 Определение подлинности и чистоты биологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот ферментного анализа Проект ОФС Протоочная цитометрия ОФС 1.7.2.0013.15 Polymerase chain reaction ОФС 1.7.2.0022.15 Identification and control of biological products purity by Western blotting ОФС 1.7.2.0033.15 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Draft OFS Flow cytometry	<1027> Flow Cytometry <1102> Immunological Test Methods—General Considerations <1103> Immunological Test Methods—Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) <1104> Immunological Test Methods—Immunoblot Analysis <1125> Nucleic Acid-Based Techniques—General <1126> Nucleic Acid-Based Techniques—Extraction, Detection, and Sequencing <1127> Nucleic Acid-Based Techniques—Amplification <1128> Nucleic Acid-Based Techniques—Microarray <1129> Nucleic Acid-Based Techniques—Genotyping	2.6.21 Nucleic acid amplification techniques 2.7.1 Immunochemical methods 2.7.24 Flow cytometry	2.6.21 Методы амплификации нуклеиновых кислот 2.7.1 Иммунохимические методы 2.7.24 Проточная цитометрия 2.6.21 Nucleic acid amplification techniques 2.7.1 Immunochemical methods 2.7.24 Flow cytometry	G3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)
Жизнеспособность Viability	—	—	2.7.29 Nucleated cell count and viability	2.7.29 Определение количества и жизнеспособности ядросодержащих клеток 2.7.29 Nucleated cell count and viability	—
pH (если применимо) pH (if applicable)	ОФС 1.2.1.0004.15 Ионометрия OFS 1.2.1.0004.15 Ionometry	791 pH	2.2.36 Potentiometric determination of ionic concentration using ion-selective electrodes	2.2.36 Потенциометрическое определение концентрации ионов с использованием ионселективных электродов 2.2.36 Potentiometric determination of ionic concentration using ion-selective electrodes	2.54 pH Determination

Примечание. ГФ РФ — Государственная фармакопея Российской Федерации, ФСША-НФ — фармакопея США—Национальный формуляр, ЕФ РБ — Государственная фармакопея Республики Беларусь, ЯФ — фармакопея Японии. Номера общих фармакопейных статей, выделенные цветом, — гармонизированные тексты фармакопейных статей; курсивом выделены фармакопейные статьи, содержащие информацию, которая применима для различных показателей качества.

«—» общие фармакопейные статьи отсутствуют.
Note. Ph. Rus.—State Pharmacopoeia of the Russian Federation, USP-NF—United States Pharmacopoeia and National Formulary, Ph. Eur.—European Pharmacopoeia, Ph. Bel.—State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus, JP—Japanese Pharmacopoeia. The numbers of harmonised general monographs are highlighted in colour; the monographs containing information that is applicable to various quality parameters are given in italics.
—no general monographs.

Европы (EDQM)¹², поэтому номера статей (монографий) у них совпадают, и в большинстве случаев тексты будут рассмотрены как один общий документ (ЕФ 10.0/ГФ РБ II).

Для удобства пользователей в фармакопее США выделяется отдельная глава, в которой перечислены все статьи, которые могут быть использованы для оценки качества препаратов на основе клеток, генов и тканей, — это глава 8¹³.

Общие требования к качеству клеточных линий, терминология

Были рассмотрены ОФС с общими требованиями всех фармакопей. ОФС содержат следующие требования.

1. Источник, история и характеристика клеточных линий.

Для КЛ человека описывают использованную ткань или орган и пригодность донора, которая включает получение данных истории болезни, физическую оценку донора и результаты скрининга на инфекционные заболевания. В ФСША 42-НФ 37, в отличие от остальных фармакопей, выделены отдельно три источника клеток: аутологичный, аллогенный и ксеногенный.

Все КЛ должны быть получены в условиях, которые обеспечивают высокую степень асептики.

2. Характеристика главного и рабочего банков клеток.

Согласно ФСША 42-НФ 37 «банк клеток представляет собой коллекцию клеток, полученных из объединенных клеток или полученных из одной клетки клона или донорской ткани...». Система банков клеток обычно состоит из главного и рабочего банков. Задача такой системы заключается в поддержании генотипической и фенотипической стабильности, что дает возможность наработки и длительного хранения стандартизованного клеточного материала для производства. Характеристика банков клеток включает определенные показатели, представленные в таблице 2.

Следует отметить, что согласно всем фармакопеям без исключения требуется проверка КЛ на подлинность, стерильность, жизнеспособность и наличие контаминантов.

3. Качество используемых реактивов и вспомогательных веществ животного и человеческого происхождения.

Все используемые реактивы и вспомогательные вещества должны иметь сертификаты, подтверждающие качество.

4. Методы испытания КЛ (показатели качества).

В таблице 3 приведены показатели качества и методы испытания КЛ, содержащиеся в фармакопеях.

Можно отметить, что абсолютно во всех фармакопеях общими требованиями являются оценка подлинности и испытание на посторонние агенты. В фармакопеях РФ, ЕС и РБ большинство методов совпадают за исключением испытаний на онкогенность. В ФСША 42-НФ 37 описывается показатель «Активность» и «Анализ, определяющие дозу», которые отражают показатель «Жизнеспособность». Показатели качества, описанные в ФСША 42-НФ 37, близки к показателям качества для экспертизы качества БМКП в России. Отсутствие показателя «Активность» КЛ в ГФ РФ XIV объясняется тем, что ОФС (1.7.2.0011.15) предназначена для субстратов получения иммунобиологических лекарственных препаратов.

Исходя из описанных общих требований можно заметить, что структуры статей в фармакопеях РФ, ЕС и РБ схожи, так как они описывают первичные и перевиваемые клетки-продуценты

для производства вакцин, в отличие от ОФС ФСША 42-НФ 37, которые посвящены продуктам на основе клеток и тканей человека и имеют совершенно другой подход к оценке качества КЛ. Главное отличие заключается в том, что в ФСША 42-НФ 37 рассматриваются требования с точки зрения применения системы менеджмента качества и использования принципов управления рисками для качества и большое внимание уделяется управлению процессом. Риск-ориентированный подход применяется к качеству КЛ на протяжении всего жизненного цикла продукта.

1. До начала производства: оценка пригодности всех компонентов, включая КЛ.

2. В процессе производства: методы выделения и отбора клеток, культивирование и дифференцировка, разработка продукта. Контроль в процессе производства включает следующие параметры:

- количество клеток и жизнеспособность;
- микробиологический контроль (стерильность, эндотоксины, микопlasма);
- экспрессия фенотипических или генотипических маркеров;
- проверка морфологии по визуальным стандартам;
- производство желаемого биологически активного вещества;
- определение удвоения популяции, числа пассажей, возраста культуры;
- анализы на наличие технологических примесей;
- мониторинг параметров системы культивирования (содержание углекислого газа (CO₂), относительная влажность, pH, содержание глюкозы и т.д.);
- функциональные тесты, такие как анализ образования колоний на агаре (колониообразующие единицы, КОЕ) и экспрессия специфических белков клеток;
- однородность содержания (с ноября 2020 г.)¹⁴;
- количественное определение твердых частиц (с ноября 2020 г.)¹⁵;
- визуальное определение клеточных агрегатов и других примесей (с ноября 2020 г.)¹⁶.

3. Контроль качества конечного продукта (КЛ, входящей в состав): показатели качества, представленные в таблице 3.

Таким образом, в отличие от фармакопей других стран, в ФСША 42-НФ 37 представлены требования к контролю в процессе производства, который гарантирует получение продукта необходимого качества и количества, а также способствует оценке влияния изменений/отклонений процесса.

Кроме того, в ФСША 42-НФ 37 предлагается использование референтного препарата, относительно которого производится внутрипроизводственный контроль. Референтный препарат должен подвергаться дополнительному тестированию и не должен храниться в той же концентрации (дозе), составе или температуре, что и конечный продукт. Его стабильность должна быть известна. В качестве примера в ОФС <1046> ФСША 42-НФ 37 приводится описание банка нормальных донорских клеток соответствующего типа для клеточного продукта с коротким сроком хранения или для аутологичного применения.

Стерильность

Стерильность. Стерильность — один из важнейших параметров при работе с КЛ, поскольку микробиологическая кон-

¹² Решение коллегии Евразийской экономической комиссии от 22.09.2015 № 119 «О концепции гармонизации фармакопей государств — членов Евразийского экономического союза».

¹³ Cell, gene, and tissue based products. USP 42-NF 37; 2019.

¹⁴ <1046> Cellular and Tissue-Based Products. USP 42-NF 37; 2019.

¹⁵ Там же.

¹⁶ Там же.

Таблица 2. Характеристика главного и рабочего банков клеток в разных фармакопеях
Table 2. Characterisation of master and working cell banks in different pharmacopoeias

Показатели, необходимые для характеристики банков клеток, согласно: Cell bank characterisation parameters		
ГФ РФ XIV ОФС 1.7.2.0011.15 Ph. Rus. 14 OFS 1.7.2.0011.15	ФСША 42-НФ 37 <1046> USP 42-NF 37 <1046>	ЕФ 10.0/ГФ РБ II 5.2.3 Ph. Eur. 10.0/Ph. Bel. 2 5.2.3
<ol style="list-style-type: none"> 1. Наименование 2. Шифр КЛ 3. Происхождение КЛ 4. Запас клеток 5. Номер пассажа и дата закладки клеток на хранение 6. Условия криоконсервации, режим хранения и жизнеспособность после размораживания 7. Параметры культивирования 8. Подлинность 9. Стерильность (в том числе микоплазмы) 10. Вирусная безопасность 11. Морфология 12. Хромосомная стабильность 13. Туморогенность (если применимо) 14. Онкогенность (если применимо) 15. Стабильность биологических свойств (количество рекомендованных пассажей) 16. Сфера применения <ol style="list-style-type: none"> 1. Name 2. CL code 3. The origin of CL 4. Cell stock 5. Passage number and date of placing cells into storage 6. Cryopreservation conditions, storage conditions, and viability after thawing 7. Cultivation parameters 8. Identity 9. Sterility (including mycoplasmas) 10. Viral safety 11. Morphology 12. Chromosomal stability 13. Tumorigenicity (if applicable) 14. Oncogenicity (if applicable) 15. Stability of biological properties (number of recommended passages) 16. Scope 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Подлинность 2. Стерильность (в том числе микоплазмы) 3. Вирусная безопасность 4. Кинетика роста и время удвоения популяции 5. Морфология 6. Процент слияния при пассировании 7. Количество клеток 8. Жизнеспособность (до и после криоконсервации) 9. Фенотипическая экспрессия желательных и нежелательных маркеров (до и после криоконсервации) 10. Мониторинг уникальных биохимических маркеров (до и после криоконсервации) 11. Оценка функциональной активности (до и после криоконсервации) 12. Анализ экспрессии генов и белков (до и после криоконсервации) 13. Экспрессия иммунных антигенов гистосовместимости (HLA/MHC) 14. Молекулярная аутентификация 15. Хромосомная стабильность <ol style="list-style-type: none"> 1. Identity 2. Sterility (including mycoplasmas) 3. Viral safety 4. Growth kinetics and population doubling time 5. Morphology 6. Percent confluence at passage 7. Cell counts 8. Viability (pre- and postcryopreservation) 9. Phenotypic expression of desired and undesired cell types (pre- and postcryopreservation) 10. Monitoring of unique biochemical markers (pre- and postcryopreservation) 11. Assessments of functional activity (pre- and postcryopreservation) 12. Gene and protein expression analysis (pre- and postcryopreservation) 13. Expression of immune histocompatibility antigens (HLA/MHC) 14. Molecular fingerprinting 15. Chromosomal stability 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Подлинность 2. Стерильность (в том числе микоплазмы) 3. Вирусная безопасность 4. Кинетика роста и время удвоения популяции 5. Морфология 6. Кариотип 7. Стабильность биологических свойств (количество рекомендованных пассажей) 8. Хромосомная стабильность <ol style="list-style-type: none"> 1. Identity 2. Sterility (including mycoplasmas) 3. Viral safety 4. Growth kinetics and population doubling time 5. Morphology 6. Karyotype 7. Stability of biological properties (number of recommended passages) 8. Chromosomal stability

Примечание. ГФ РФ — Государственная фармакопея Российской Федерации, ФСША-НФ — фармакопея США—Национальный формуляр, ЕФ — Европейская фармакопея, ГФ РБ — Государственная фармакопея Республики Беларусь, КЛ — клеточная линия.

Note. Ph. Rus.—State Pharmacopoeia of the Russian Federation, USP-NF—United States Pharmacopoeia and National Formulary, Ph. Eur.—European Pharmacopoeia, Ph. Bel.—State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus, CL—cell line.

таминация может привести к их гибели или тяжелым последствиям при применении у пациентов.

Основным отличием в рассматриваемых фармакопеях является информация об используемых средах для культивирования. В ФСША 42-НФ 37, ЕФ 10.0 и ЯФ XVII представлены только тиогликолевая среда и среда на основе гидролизатов соевых бобов и казеина. Однако в фармакопеях Республики Беларусь и Российской Федерации также содержится информация о среде Сабуро, которая подходит для выявления как грибов, так и аэробных бактерий.

В ФСША 42-НФ 37, в отличие от ЕФ 10.0 и ЯФ XVII, присутствует информация о модификации сред для инактивации содержащегося в образце пенициллина или цефалоспорина. Подобные действия необходимы, поскольку наличие антибактериальных веществ может маскировать контаминацию. В ФСША 42-НФ 37 уточняется возможность использования альтернативных микроорганизмов для испытаний питательных

сред, более подробно изложено о разбавителях и вспомогательных жидкостях для мембранной фильтрации (аналогичный раздел существует в ГФ РФ XIV).

В ГФ РФ XIV имеются некоторые отличия, а именно представлена подробная информация о различных способах устранения антимикробного действия препарата в образце и содержится указание о значениях температуры и продолжительности процесса, которые необходимы для стерилизации питательных сред (в других фармакопеях указывается только на сам факт необходимости стерилизации).

В ЕФ 10.0, ФСША 42-НФ 37, ЯФ XVII, ГФ РБ II в сравнении с ГФ РФ XIV по-разному описываются испытания на стерильность для испытуемых образцов методом мембранной фильтрации (дозировка, pH).

Микробиологическая чистота. Необходимость проведения испытаний на микробиологическую чистоту (МБЧ) при работе с КЛ обусловлена тем, что микроорганизмы-конта-

Таблица 3. Показатели качества и методы испытания клеточных линий согласно разным фармакопеям
Table 3. Cell line quality characteristics and respective test methods according to different pharmacopoeias

Показатели качества клеточных линий согласно: Cell line quality characteristics		
ГФ РФ XIV ОФС 1.7.2.0011.15 Ph. Rus. 14 OFS 1.7.2.0011.15	ФСША 42-НФ 37 <1046> USP 42-NF 37 <1046>	ЕФ 10.0/ГФ РБ II 5.2.3 Ph. Eur. 10.0/Ph. Bel. 2 5.2.3
<p>1. Морфология - микроскопия</p> <p>2. Подлинность - электрофорез - кариологический анализ хромосом (методы дифференциального окрашивания (C, G, Q и R)) - молекулярно-генетические методы (полимеразная цепная реакция, секвенирование) - иммунологические методы (реакция гемагглютинации, метод смешанной агглютинации и др.)</p> <p>3. Оценка туморогенности <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> - метод инвазивности в органичные культуры - испытания на иммуносупрессивных или имеющих генетическую иммунную недостаточность животных</p> <p>4. Оценка онкогенности <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> - субкультивирование клеток - испытания на иммуносупрессивных или имеющих генетическую иммунную недостаточность животных</p> <p>5. Испытание на присутствие посторонних агентов</p> <p>стерильность - методы мембранной фильтрации и прямого посева</p> <p>микоплазма - культуральный и цитохимический методы - полимеразная цепная реакция</p> <p>эндогенные ретровирусы - полимеразная цепная реакция - методы иммунофлуоресценции или иммуноферментный анализ - электронная микроскопия</p> <p>1. Morphology - microscopy</p> <p>2. Identity - electrophoresis - karyotype analysis of chromosomes (differential staining methods (C, G, Q and R)) - molecular genetic methods (polymerase chain reaction, sequencing) - immunological methods (hemagglutination assay, mixed-antigen agglutination method, etc.)</p> <p>3. Assessment of tumorigenicity <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> - organ culture assay for invasiveness - tests in immunosuppressed/immunodeficient animals</p> <p>4. Assessment of oncogenicity <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> - cell subculturing - tests in immunosuppressedimmunodeficient animals</p> <p>5. Test for the presence of extraneous agents</p> <p>sterility - membrane filtration and direct inoculation methods</p> <p>mycoplasma - culture and indicator cell culture methods</p> <p>endogenous retroviruses - polymerase chain reaction - immunofluorescence methods or enzyme-linked immunosorbent assay - electron microscopy</p>	<p>1. Подлинность - проточная цитометрия - иммуноферментный анализ - фингерпринтинг (метод «отпечатков пальцев»)</p> <p>2. Стерильность - методы мембранной фильтрации и прямой инокуляции - окраска по Граму - полимеразная цепная реакция</p> <p>3. Микоплазма - культуральный и цитохимический методы - полимеразная цепная реакция - иммуноферментный анализ</p> <p>4. Бактериальные экзотоксины - гель-тромб тест - турбидиметрический метод - хромогенный метод</p> <p>5. Активность - подсчет жизнеспособных клеток - анализ образования колоний - проточная цитометрия - испытания на животных моделях</p> <p>6. Анализы, определяющие дозу (жизнеспособность) - подсчет с помощью окрашивания трипановым синим - анализ FACS или проточная цитометрия - подсчет с помощью гемацитометра - подсчет с помощью счетчика клеток</p> <p>1. Identity - flow cytometry - enzyme-linked immunosorbent assay - nucleic acid fingerprinting</p> <p>2. Sterility - membrane filtration and direct inoculation methods - Gram staining - polymerase chain reaction</p> <p>3. Mycoplasma - culture and indicator cell culture methods - polymerase chain reaction - enzyme-linked immunosorbent assay</p> <p>4. Bacterial Endotoxins - gel-clot method - turbidimetric method - chromogenic method</p> <p>5. Potency - viable cell number - colony-formation assay - flow cytometry - animal models tests</p> <p>6. Dose-defining assays (viability) - counting by trypan blue staining - by FACS analysis or flow cytometry - counting by hemacytometer - counting by cell counter</p>	<p>1. Морфология - микроскопия</p> <p>2. Подлинность - фингерпринтинг (метод «отпечатков пальцев») - иммуноферментный анализ - проточная цитометрия - полимеразная цепная реакция (только в ЕФ 10.0)</p> <p>3. Оценка туморогенности (канцерогенности в ГФ РБ) <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> - метод инвазивности в органичные культуры - испытания на иммуносупрессивных или имеющих генетическую иммунную недостаточность животных</p> <p>4. Испытание на присутствии посторонних агентов</p> <p>стерильность - методы мембранной фильтрации и прямой инокуляции</p> <p>микоплазма - культуральный и цитохимический методы - полимеразная цепная реакция</p> <p>эндогенные ретровирусы - полимеразная цепная реакция</p> <p>1. Morphology - microscopy</p> <p>2. Identity - nucleic acid fingerprinting - enzyme-linked immunosorbent assay - flow cytometry - polymerase chain reaction (only in Ph. Eur.)</p> <p>3. Assessment of tumorigenicity (carcinogenicity in Ph. Bel.) <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> - organ culture assay for invasiveness - tests in immunosuppressed/immunodeficient animals</p> <p>4. Test for the presence of extraneous agents</p> <p>sterility - membrane filtration and direct inoculation methods</p> <p>mycoplasma - culture and indicator cell culture methods</p> <p>endogenous retroviruses - polymerase chain reaction</p>

Примечание. ГФ РФ — Государственная фармакопея Российской Федерации, ФСША-НФ — фармакопея США—Национальный формуляр, ЕФ — Европейская фармакопея, ГФ РБ — Государственная фармакопея Республики Беларусь.
Note. Ph. Rus.—State Pharmacopoeia of the Russian Federation, USP-NF—United States Pharmacopoeia and National Formulary, Ph. Eur.—European Pharmacopoeia, Ph. Bel.—State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus.

минанты могут воздействовать на терапевтическую активность продукта (биодegradация), а также могут быть причиной развития некоторых инфекционных заболеваний. Не выявленные вовремя микроорганизмы могут стать причиной возникновения новых штаммов антибиотикорезистентных микроорганизмов.

В ФСША 42-НФ 37, ЕФ 10.0 и ГФ РБ II ОФС по оценке МБЧ разделены на две части. Первая часть посвящена определению общего количества жизнеспособных аэробов, вторая — испытаниям на наличие специфических микроорганизмов. Отмечено, что ОФС, посвященные МБЧ, в ГФ РФ XIV и ЯФ XVII имеют единую структуру.

Во всех фармакопеях указано, что испытания на МБЧ должны проводиться в асептических условиях, с использованием методов, описанных в ОФС, которые включают в себя правила по подготовке образца к анализу, отбору образцов для анализа, количественному определению микроорганизмов и, в некоторых случаях, их идентификации, а также требования к приготовлению питательных сред, необходимых для проведения испытаний на МБЧ.

В ГФ РФ XIV изложена информация о предназначении методов определения МБЧ для нестерильных и биологических ЛС, а во всех остальных фармакопеях указано, что эти методы не применимы к продуктам, содержащим жизнеспособные микроорганизмы в качестве активных ингредиентов. Только в ГФ РФ XIV приводится подробное описание, какое количество микроорганизмов допустимо для каждой лекарственной формы.

Во всех фармакопеях указаны эталонные тест-штаммы для проведения испытаний на МБЧ: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* и *Aspergillus brasiliensis*. При этом в ГФ РФ XIV помимо вышеперечисленных штаммов представлены *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* и *Staphylococcus epidermidis*. Также во всех фармакопеях описана необходимость определения наличия антимикробного действия исследуемого образца. В ГФ РФ XIV представлены следующие методы определения: определение антимикробного действия в условиях испытания на МБЧ и метод репликаций. ФСША 42-НФ 37, ЯФ XVII, ГФ РБ II, ЕФ 10.0 лишь указывают на то, что у образца «должно быть приемлемым определению микробной контаминации». Если этому определению мешает антимикробное действие образца, следует разработать методику для его устранения. В качестве устранения антимикробного действия все фармакопеи предлагают: увеличение объема разбавителя или питательной среды, включение нейтрализующего агента, мембранную фильтрацию или комбинацию этих способов.

В фармакопеях представлены следующие методы количественного определения микроорганизмов: чашечные агаровые методы (глубинный метод, двухслойный метод и др.), метод мембранной фильтрации, метод наиболее вероятных чисел.

В качестве тест-штаммов микроорганизмов в ГФ РФ XIV указаны энтеробактерии, устойчивые к желчи, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*. В остальных фармакопеях, в дополнение к перечисленным выше микроорганизмам, предложен *Clostridium sporogenes*.

Только в ГФ РФ XIV регламентированы биохимические тесты для идентификации микроорганизмов. К ним относятся тесты на выявление фермента цитохромоксидазы (оксидазный тест), индола, коагулазы.

Во всех фармакопеях подробно описан состав сред и особенности их изготовления, но только в ГФ РФ XIV представ-

лены такие разделы, как: оценка качества питательных сред, ростовых свойств, определение селективных и диагностических свойств питательных сред, стерильность и хранение питательных сред.

На основании рассмотренных показателей можно сделать вывод, что статья ГФ РФ XIV о МБЧ охватывает максимальное количество показателей МБЧ среди аналогичных статей сравнимых фармакопей.

Альтернативные методы контроля микробиологической чистоты. Альтернативные методы контроля МБЧ КЛ представлены в качестве справочной информации в виде отдельной ОФС во всех фармакопеях кроме ГФ РФ XIV и могут быть использованы как альтернативные методы контроля в случаях, когда основные методы не выполнимы и/или недостаточны. Все методы подразделяются на методы прямого и косвенного выявления микроорганизмов (табл. 4).

В ЕФ 10.0 и ГФ РБ II предлагается самый большой выбор методов, при этом в данных ОФС помимо разделения на прямые и косвенные методы приведена отличная от других категоризация на подгруппы (основанные на росте микроорганизмов, анализе клеточных компонентов и др.).

В ФСША 42-НФ 37 иначе представлен подход к применению альтернативных методов для подтверждения стерильности продуктов. Ее содержание основано в первую очередь на оценке риска методов, отличных от тех, что описаны в ОФС Стерильность.

В ГФ РФ XIV в настоящее время отсутствует упоминание об альтернативных методах определения МБЧ КЛ.

Микробиологический контроль клеточных продуктов. В ЕФ 10.0 и ГФ РБ II представлены статьи о микробиологическом контроле клеточных продуктов, в России разрабатывается проект ОФС о микробиологическом контроле БМКП.

В ГФ РБ II отмечено, что при работе с КЛ предпочтительнее использовать данную ОФС вместо статьи о стерильности, поскольку методы, описанные в статье о микробиологическом контроле клеточных продуктов, обладают большей чувствительностью, более широким диапазоном применения и проводятся в более короткие сроки.

В статьях ГФ РБ II и ЕФ 10.0, а также в проекте ОФС ГФ РФ указан перечень микроорганизмов, используемых в качестве стандартов при испытаниях ростовых свойств, описаны правила отбора образцов для испытаний, указаны правила хранения образцов, необходимость нейтрализации антимикробного действия.

Во всех фармакопеях в качестве испытания рассматривается метод культурального посева, но в ЕФ 10.0 и ГФ РБ II отмечено, что данное испытание следует проводить не менее чем на 2 подходящих средах. В ЕФ 10.0 предлагается два температурных диапазона для более точного выявления контаминантов при последующей инкубации. Также в ЕФ 10.0 указывается на необходимость проверки пригодности системы на специфичность (отсутствие ложноположительного результата), чувствительность, воспроизводимость и надежность.

В ЕФ 10.0, учитывая небольшой срок годности некоторых клеточных продуктов (от нескольких суток), уточняется, что в некоторых случаях испытания на МБЧ не могут быть проведены до момента введения продукта пациенту. Также в ЕФ 10.0 указано, что для анализа на МБЧ должен быть использован не только супернатант, но и сами клетки. Проект ОФС ГФ РФ допускает использование пациентом БМКП до окончательной экспертизы продукта при условии отсутствия контаминантов при окраске по Граму.

Использование описанных выше альтернативных методик возможно при условии их валидации.

Микоплазма

Тестирование на микоплазму является необходимым требованием контроля качества КЛ.

Среди всех представленных фармакопей только в ФСША 42-НФ 37 приводится описание микоплазм, отмечается, что их нельзя выявить при помощи окраски по Граму, и объясняются причины опасности микоплазменной контаминации.

Во всех фармакопеях указана необходимость проведения работы с КЛ в асептических условиях.

В описании культурального метода в тексте ЕФ 10.0 и ГФ РБ II предлагается использовать по крайней мере один штамм из тест-штаммов, в ЯФ XVII и ФСША 42-НФ 37 — по меньшей мере два известных вида или штамма. В ГФ РФ XIV предлагается использовать один конкретный стандартный образец *Mycoplasma arginini* G 230, но допускается использование других в необходимом количестве.

В качестве питательных сред в ГФ РФ XIV рекомендуется использовать среды Каган полужидкую (для накопления микоплазм) и плотную (для подтверждения наличия микоплазм), а также представлены две схемы культивирования: с инкубированием в течение 14 сут и с предварительным инкубированием на 5–7 сут и дальнейшим инкубированием в течение 14 сут. В ГФ РБ II, ЕФ 10.0, ФСША 42-НФ 37 описаны следующие питательные жидкие и твердые среды: Хейфлика (для общего определения микоплазм), Фрея (рекомендованные для определения *M. synoviae*) и Фриза (рекомендованные для определения микоплазм, которые имеют происхождение, отличное от птичьего). В ЯФ XVII информация о питательных средах не представлена и содержится только информация о культивировании в течение 14 сут, в ФСША 42-НФ 37, ГФ РБ II, ЕФ 10.0 изложена информация об инкубации жидких сред в течение 21 сут, а твердых сред — не менее 14 сут или

Таблица 4. Альтернативные методы контроля микробиологической чистоты в разных фармакопеях
Table 4. Alternative methods for control of microbiological quality in different Pharmacopoeias

ФСША 42-НФ 37 <1071> USP 42-NF 37 <1071>	ЯФ XVII G4 JP 17 G4	ЕФ 10.0/ГФ РБ II 5.1.6 Ph. Eur. 10.0/Ph. Bel. 2 5.1.6
<p>Методы прямого выявления:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Твердофазная цитометрия 2) Проточная цитометрия <p>Direct methods:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Solid phase cytometry 2) Flow cytometry 	<p>Методы прямого выявления:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Твердофазная цитометрия 2) Проточная цитометрия 3) Метод прямой эпифлуоресцентной фильтрации <p>Direct methods:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Solid phase cytometry 2) Flow cytometry 3) Direct epifluorescent filtration technique 	<p>Методы прямого выявления:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Твердофазная цитометрия 2) Проточная цитометрия 3) Метод прямой эпифлуоресцентной фильтрации <p>Direct methods:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Solid phase cytometry 2) Flow cytometry 3) Direct epifluorescent filtration technique
<p>Методы косвенного выявления:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Билюминесценция 2) Микрокалориметрия 3) Амплификация нуклеиновых кислот 4) Метод измерения потребляемого или продуцируемого газа <p>Indirect methods:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Bioluminescence 2) Microcalorimetry 3) Nucleic acid amplification 4) Measurement of consumption or production of gas 	<p>Методы косвенного выявления:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Иммунологические методы 2) Билюминесценция 3) Метод микроколоний 4) Метод импеданса 5) Метод измерения потребляемого или продуцируемого газа 6) Профили жирных кислот 7) ИК-спектроскопия 8) Масс-спектрометрия 9) Амплификация нуклеиновых кислот 10) Методы аутентификации клеточных линий 11) Высокопроизводительное секвенирование <p>Indirect methods:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Immunological methods 2) Bioluminescence 3) Microcolony method 4) Impedance method 5) Measurement of consumption or production of gas 6) Fatty acid profiles 7) Infrared spectroscopy 8) Mass spectrometry 9) Nucleic acid amplification 10) Cell line authentication 11) High-throughput sequencing 	<p>Методы косвенного выявления:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Иммунологические методы 2) Билюминесценция 3) Метод микроколоний 4) Метод импеданса 5) Метод измерения потребляемого или продуцируемого газа 6) Профили жирных кислот 7) ИК-спектроскопия 8) Масс-спектрометрия 9) Амплификация нуклеиновых кислот 10) Методы аутентификации клеточных линий 11) Микрокалориметрия 12) Турбидиметрия 13) Метод, основанный на бактериофагах (только в ГФ РБ) 14) Разработка питательных сред для детекции микроорганизмов 15) Биохимический анализ, основанный на физиологических реакциях <p>Indirect methods:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Immunological methods 2) Bioluminescence 3) Microcolony method 4) Impedance method 5) Measurement of consumption or production of gas 6) Fatty acid profiles 7) Infrared spectroscopy 8) Mass spectrometry 9) Nucleic acid amplification 10) Cell line authentication 11) Microcalorimetry 12) Turbidimetry 13) Bacteriophage-based method (only in Ph. Bel.) 14) Development of culture media for detection of microorganisms 15) Biochemical assays based on physiological reactions

Примечание. ФСША-НФ — фармакопея США—Национальный формуляр, ЯФ — фармакопея Японии, ЕФ — Европейская фармакопея, ГФ РБ — Государственная фармакопея Республики Беларусь.

Note. USP-NF—United States Pharmacopoeia and National Formulary, JP—Japanese Pharmacopoeia, Ph. Eur.—European Pharmacopoeia, Ph. Bel.—State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus.

Таблица 5. Условия проведения испытания на пирогенность в разных фармакопеях
Table 5. Pyrogen test conditions in different pharmacopeias

Параметр Parameter	ГФ РФ XIV Ph. Rus. 14	ФСША 42-НФ 37 USP 42-NF 37	ЯФ XVII JP 17	ЕФ 10.0/ГФ РБ II Ph. Eur. 10.0/Ph. Bel. 2
Объем инъекции, мл Injection volume, mL	0,2–10	10		0,5–10
Время введения дозы, мин (не более) Duration of administration, min (max)	2	10		4

Примечание. ГФ РФ — Государственная фармакопея Российской Федерации, ФСША-НФ — фармакопея США—Национальный формуляр, ЯФ — фармакопея Японии, ЕФ — Европейская фармакопея, ГФ РБ — Государственная фармакопея Республики Беларусь.

Note. Ph. Rus.—State Pharmacopoeia of the Russian Federation, USP-NF—United States Pharmacopoeia and National Formulary, JP—Japanese Pharmacopoeia, Ph. Eur.—European Pharmacopoeia, Ph. Bel.—State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus.

20–21 сут, если необходим пересев (который инкубируется в течение 7 сут).

В соответствии с ГФ РФ XIV среда считается чувствительной и признается годной для использования, если «не позднее 7 суток инкубации визуально обнаруживают рост стандартного образца тест-штамма *M. arginini* G 230 при посеве 10–100 КОЕ», не уточняя, в каком количестве должен быть выявлен рост тест-штамма, а в ФСША 42-НФ 37 и ЯФ XVII указано «приблизительно 100 КОЕ или 100 изменяющих цвет единиц», растущих в выбранных условиях инкубации. ЕФ 10.0 и ГФ РБ II не предоставляют подобной информации.

Еще одним различием между фармакопеями является наличие информации о показателях влажности и процентного соотношения CO₂ при инкубации в описании культурального метода (регламентируются только в ЯФ XVII и ФСША 42-НФ 37). Также только в ЯФ XVII отсутствует описание определения ингибирующего действия испытуемого образца.

Во всех фармакопеях в качестве методов контроля микоплазм предлагаются культуральный и цитохимический методы, а также отмечается, что допустимо использование методов амплификации нуклеиновых кислот.

Бактериальные эндотоксины

Присутствие бактериальных эндотоксинов (БЭ), являющихся пирогенами, в инъекционных препаратах может стать причиной различных реакций организма: от лихорадки до необратимого и смертельного септического шока [1]. Поэтому основные источники БЭ (КЛ и все вспомогательные вещества), используемые для производства продуктов на основе КЛ, проверяются на содержание БЭ.

Правила определения содержания БЭ одинаковы во всех фармакопеях. Определяющий тест основан на специфической реакции лизата амебоцитов из крови мечехвоста (*Limulus polyphemus* или *Tachypleus tridentatus*) с БЭ, в результате которой происходит изменение реакционной смеси, пропорциональное концентрации БЭ. Во всех ОФС предлагается перед испытанием предварительно подтверждать чувствительность лизата амебоцитов, а также проводить испытание на наличие мешающих реакции факторов.

Тест может проводиться тремя методами: гель-тромб, турбидиметрический и хромогенный. Все фармакопеи регламентируют использование качественного гель-тромб метода в качестве арбитражного (в случае сомнений и разногласий).

По требованиям фармакопей допустимое содержание БЭ составляет 5 ЕЭ/кг в 1 ч для испытуемого лекарственного препарата при пути введения, отличном от интратекального.

Безопасность

Пирогенность. Помимо теста на БЭ существует биологический метод определения пирогенности на кроликах. Он представлен во всех фармакопеях и основан на измерении температуры тела у кроликов до и после инъекции исследуемого продукта.

ОФС всех фармакопей описывают требования к содержанию животных и их подготовке к проведению испытания. Для испытания пригодны здоровые кролики массой не менее 1,5 кг.

Испытуемый продукт нагревают до температуры (37 ± 2) °С и вводят в ушную вену в определенном объеме и за определенный период времени, указанные в каждой ОФС (табл. 5).

Тест проводится на группе из трех кроликов, результат оценивается на основе суммы индивидуальных максимальных значений повышения температуры. Измерения температуры после внутривенного введения проводят с интервалом не более 30 мин на протяжении трех часов.

Испытание можно проводить поэтапно, прибавляя на каждом этапе по три особи. Максимальное количество этапов в ГФ РФ XIV, ЕФ 10.0 и ГФ РБ II не должно превышать 4, в ФСША 42-НФ 37 и ЯФ XVII — 3.

Исследуемый продукт признается пирогенным, если в результате всех этапов испытания зарегистрировано индивидуальное повышение температуры свыше 0,5 °С более чем у трех кроликов (в ГФ РФ XIV и ФСША 42-НФ 37) или если результат выше указанного в ОФС значения (табл. 6).

Вирусная безопасность. При производстве продуктов, полученных с использованием материалов человеческого или животного происхождения, существует риск вирусной контаминации.

ЕФ 10.0 и ГФ РБ II только кратко передают смысл общих требований к вирусной безопасности и ссылаются для более подробных рекомендаций на руководство ICH Q5A(R1)¹⁷. Требования, описанные в руководстве, совпадают с описанными в ОФС ФСША 42-НФ 37.

В ОФС указывается, что риску вирусной контаминации подвержены продукты, полученные из ткани, органа или жидкости живых доноров, а также при культивировании КЛ *in vitro* и *in vivo*. Причинами возникновения вирусной контаминации могут быть использование изначально инфицированных вспомогательных материалов и КЛ или же внесение постороннего контаминанта (неэндогенного вируса) в процессе производства. Таким образом, все фармакопеи выделяют ключевые пункты для контроля вирусной безопасности: выбор и оценка исход-

¹⁷ ICH Q5A(R1) Quality of biotechnological products: viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin, 1997.

ного материала, оценка производственного процесса и возможности элиминации и/или инактивации вирусов, а также контроль конкретных свойств продуктов на соответствующих этапах производства.

Что касается КЛ, то возможными способами контаминации вирусами главного и рабочего банков клеток могут быть: получение КЛ от инфицированного донора; использование вируса для получения иммортализованных КЛ; использование контаминированных биологических реагентов, таких как сыворотка крови животных; контаминация во время обработки клеток. Во всех фармакопеях содержится информация о том, что помимо этого КЛ сама по себе может иметь латентную или персистирующую вирусную инфекцию (например, герпесвирус) или эндогенный ретровирус, что следует учитывать. Такие вирусы могут в процессе культивирования перейти из латентной фазы в активную (инфекционную).

В ЯФ XVII рекомендуется проверять исходные КЛ человека на наличие возбудителей гепатитов В, С и ВИЧ методами амплификации нуклеиновых кислот. В фармакопеях России и США не конкретизирована информация о методах и объемах тестирования на вирусную контаминацию, которые зависят от множества факторов и учитываются в индивидуальном порядке. ОФС ФСША 42-НФ 37 и ЯФ XVII рекомендуют однократное проведение тестов на вирусы для главного и рабочего банков клеток и КЛ предельного для производства клеточного возраста *in vitro* (клетки, находящиеся на максимальном уровне удвоения популяции). Главные банки клеток должны тестироваться на эндогенные и неэндогенные вирусы, рабочие банки клеток — только на неэндогенные вирусы, а КЛ предельного для производства клеточного возраста *in vitro* — на эндоген-

ные вирусы, которые могли быть не обнаружены в банках клеток. Примеры рекомендуемых тестов описаны только в ФСША 42-НФ 37 (табл. 7).

Исследования *in vitro* включают в себя инокуляцию исследуемого материала в различные восприимчивые индикаторные КЛ и обнаружение как цитопатических, так и гемадсорбирующих вирусов. Исследования *in vivo* предполагают введение исследуемого материала новорожденным и взрослым мышам, а также куриным эмбрионам. Исследования выработки антител проводят для того, чтобы выявить видоспецифичные вирусы, присутствующие в КЛ грызунов. Для этого инокуляцию проводят здоровым животным и оценивают уровень сывороточных антител или изменение ферментативной активности.

Кроме того, ФСША 42-НФ 37 и ЯФ XVII предусматривают необходимость тестирования необработанного нерасфасованного продукта, который представляет собой один или несколько объединенных сборов клеток и культуральной среды. Для проверки рекомендуются скрининговые тесты *in vitro* с использованием одной или нескольких КЛ, а также методы амплификации нуклеиновых кислот или другие подходящие.

Во всех ОФС процесс производства должен включать один или несколько этапов элиминации и/или инактивации вирусов, для которых доказано снижение концентрации модельных вирусов. Для оценки процесса элиминации и/или инактивации в ФСША 42-НФ 37 и ЯФ XVII предлагается использование специфических и неспецифических, а также релевантных (только в ФСША 42-НФ 37) модельных вирусов, которые выбираются с учетом следующих характеристик: ДНК- или РНК-содержащий вирус; с оболочкой или без нее; размер генома вируса; резистентность к физико-химическим

Таблица 6. Оценка результатов испытания на пирогенность согласно разным фармакопеям
Table 6. Evaluation of pyrogen test results according to different pharmacopoeias

Количество кроликов Number of rabbits	Продукт считается пирогенным, если сумма повышения температур (°C) превышает: Product is considered pyrogenic if the sum of the temperature rises (°C) exceeds:			
	ГФ РФ XIV Ph. Rus. 14	ФСША 42-НФ 37 USP 42-NF 37	ЯФ XVII JP 17	ЕФ 10.0/ ГФ РБ II Ph. Eur. 10.0/ Ph. Bel. 2
3	2,8	—	3,0	2,65
6	4,3	—	4,2	4,3
8	—	3,3	—	—
9	6,0	—	5,0	5,95
12	6,6	—	—	6,6

Примечание. ГФ РФ — Государственная фармакопея Российской Федерации, ФСША-НФ — фармакопея США—Национальный формуляр, ЯФ — фармакопея Японии, ЕФ — Европейская фармакопея, ГФ РБ — Государственная фармакопея Республики Беларусь.
«—» нет данных.

Note. Ph. Rus.—State Pharmacopoeia of the Russian Federation, USP-NF—United States Pharmacopoeia and National Formulary, Ph. Eur.—European Pharmacopoeia, Ph. Bel.—State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus, JP—Japanese Pharmacopoeia.
— no data available.

Таблица 7. Примеры тестов на вирусы для банков клеток и клеток предельного для производства клеточного возраста *in vitro* в фармакопее США
Table 7. Examples of USP virus tests for cell banks and cells at the limit of *in vitro* cell age used for production

Наименование тестов на Tests for	
ретровирусы и другие эндогенные вирусы retroviruses and other endogenous viruses	неэндогенные вирусы non-endogenous viruses
1. Инфицирующая способность Infectivity	1. Исследования <i>in vitro</i> In vitro assays
2. Электронная микроскопия Electron microscopy	2. Исследования <i>in vivo</i> In vivo assays
3. Обратная транскрипция Reverse transcriptase	3. Исследования выработки антител Antibody production tests
4. Прочие вирус-специфичные тесты Other virus-specific tests	4. Прочие вирус-специфичные тесты Other virus-specific tests

воздействиям и др. Для валидации необходимо подобрать минимум три модельных вируса.

Кроме того, в ФСША 42-НФ 37 и ЯФ XVII приводится перечень вирусов, используемых для исследований: вирус везикулярного стоматита, вирус парагриппа, вирус лейкемии мышей (MuLV) и др. Тип и объем тестов и исследований зависят от множества факторов и подбираются индивидуально и поэтапно для каждого процесса производства.

В фармакопеях предлагаются физические, химические и комбинированные методы элиминации и/или инактивации вирусов.

Тестирование конечного продукта в ГФ РФ XIV предусматривает проверку на гепатит В, С, ВИЧ-1 и ВИЧ-2, другие фармакопей не конкретизируют необходимость тестирования конечного продукта, при этом в ЯФ XVII рекомендуется тестирование конечного продукта методами амплификации нуклеиновых кислот, ориентируясь на наиболее опасный вирус среди тех, которые могут присутствовать. Во всех ОФС акцентируется внимание на том, что вирусная безопасность конечного продукта может быть всецело обеспечена за счет тщательной подготовки и подтверждения того, что процесс производства обеспечивает элиминацию и/или инактивацию вирусов.

В отличие от других фармакопей, в ФСША 42-НФ 37 представлена ОФС <1237>, в которой подробно описаны вирусологические методы исследования. Весь текст ОФС делится на три раздела, в каждом описывается обнаружение и анализ наиболее важных групп вирусов, а также наиболее часто используемые для этого молекулярно-биологические и иммунологические методы.

Вспомогательные материалы. Во всех фармакопеях общее предписание о требованиях к вспомогательным материалам биологического происхождения приводится в ОФС с общими требованиями к качеству КЛ. Отдельные ОФС по вспомогательным материалам представлены только в ФСША 42-НФ 37 и ЕФ 10.0. ОФС ГФ РФ XIV и ЯФ XVII о вирусной безопасности только указывают на необходимость наличия информации о проверке реагентов и сырья.

К вспомогательным материалам биологического происхождения относятся сыворотки, культуральная среда, пищеварительные ферменты, факторы роста и другие вещества, а также фидерные клетки (только в ФСША 42-НФ 37). В ЕФ 10.0 они подразделяются на четыре класса: сыворотка и ее производные; белки, полученные с помощью технологии рекомбинантной ДНК; белки, экстрагированные из биологического материала, и векторы. В ФСША 42-НФ 37 выделяются материалы для предполагаемого использования: в терапевтических целях, в исследовательских целях.

Во всех ОФС описывается риск-ориентированный подход, требования к качеству материалов и испытания, которые должны предоставляться в сертификате анализа на эти материалы. В них указано, что ответственность за квалификацию лежит на производителе вспомогательных материалов, а ответственность за обеспечение качества продукта — на пользователе. Кроме того, в ФСША 42-НФ 37 предлагается возможность создания программы квалификации, которая оценивает риск, учитывая количество используемых для производства вспомогательных материалов и этап их внедрения в процесс.

Качество вспомогательных материалов может влиять на стабильность, безопасность, активность и чистоту конечного продукта. Поэтому необходим тщательный контроль до и в про-

цессе производства, а также проверка содержания в конечном продукте во избежание таких нежелательных последствий, как иммунный ответ, токсические эффекты или ухудшение эффективности [2]. Помимо этого, вспомогательные материалы могут быть источником контаминации. Все материалы, которые контактируют с КЛ, должны быть известного происхождения, проследиваться и иметь подтвержденные подлинность, чистоту, стерильность, биологическую активность, а также отсутствие вирусной контаминации и оценку риска передачи трансмиссивной губчатой энцефалопатии. По возможности рекомендуется замена использования материалов человеческого и животного происхождения на синтетические, или, если это невозможно, минимизация риска передачи посторонних агентов.

Особое внимание во всех фармакопеях уделено проверке определенных реактивов и материалов на вирусную контаминацию. В ГФ РФ XIV и ЯФ XVII отмечено, что бычья сыворотка не должна содержать потенциально опасные для человека вирусы (вирус бычьей диареи, инфекционного бычьего ринотрахеита и парагриппа 3). Получаемый от свиней трипсин необходимо проверять на наличие парвовируса свиней. Другим примером может служить протокол культивирования кератиноцитов для использования в медицинской практике по методике Rheinwatd и Green [3] с применением мышинных фибробластов в качестве фидерных клеток. Поскольку многие видоспецифичные вирусы, присутствующие в КЛ грызунов, могут передаваться человеку, в таких случаях необходимо проводить тщательные исследования фидерных клеток на наличие вирусов.

Подробно описывается только в ФСША 42-НФ 37 оценка (иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразная цепная реакция (ПЦР)) и удаление остаточных вспомогательных материалов. Они включают разработку этапов удаления путем разбавления, разделения или инактивации, а также путем разработки анализов для своевременного обнаружения и оценки количества таких реактивов во время производства и в конечном продукте.

Трансмиссивная губчатая энцефалопатия (ТГЭ). Обязательным требованием для материалов животного происхождения является принятие мер по снижению риска передачи ТГЭ, поскольку это может стать причиной инфицирования КЛ, находящейся в составе конечного продукта. Подробные ОФС существуют во всех фармакопеях, кроме ФСША 42-НФ 37 (в США рекомендации на эту тему прописаны в документах Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA)). Требования фармакопей разных стран идентичны.

Исходные материалы, используемые в производстве, должны быть получены от животных, пригодных для использования в пищу человеком и выдержавших до и после забоя проверку в соответствии с требованиями регуляторных органов, за исключением материалов, полученных из живых животных, которые признаны здоровыми по результатам клинического обследования. Существует классификация стран по степени риска передачи ТГЭ от Всемирной организации по охране здоровья животных: с незначительным риском, с контролируемым риском и с неопределенным риском¹⁸. Безопасными являются материалы из стран с незначительным риском. По возможности следует использовать аналоги таких материалов синтетического происхождения. Кроме того, органы и ткани классифицируют по различному уровню инфекционности: высокая инфекционная активность, более низкая инфекционная активность и без обнаруженной инфекционной активности¹⁹.

¹⁸ Bovine spongiform encephalopathy (BSE). The World Organisation for Animal Health. <https://www.oie.int/animal-health-in-the-world/official-disease-status/bse/list-of-bse-risk-status>

¹⁹ WHO Tables on tissue infectivity distribution in transmissible spongiform encephalopathies (WHO/EMP/QSM/2010.1); 2010.

При выборе исходного материала следует учитывать обе классификации.

В процесс производства допускается вводить стадии удаления или инактивации возбудителей ТГЭ, при этом должна быть доказана эффективность таких мер, поскольку возбудители ТГЭ устойчивы к большинству процедур по инаktivации. Все фармакопеи описывают методы инаktivации ТГЭ: физический (нагревание, измельчение и др.), химический (ферментативная обработка и др.) и комбинированный.

Все ОФС содержат требования для отдельных, наиболее значимых материалов, таких как эмбриональная бычья сыворотка, коллаген и др.

Криоконсервация клеточных линий. Среди всех фармакопей только в ФСША 42-НФ 37 уделяется особое внимание криоконсервации КЛ и продуктов на их основе: описываются основные криопротекторы, механизмы их действия и важность анализа токсичности при разработке новых протоколов криоконсервации для оценки потери жизнеспособности или изменения функциональности КЛ.

Также ОФС содержит конкретные рекомендации по криоконсервации гемопоэтических стволовых клеток (СК), мезенхимальных СК, лимфоцитов и плюрипотентных СК человека.

Методы подтверждения безопасности клеточных линий. Во всех фармакопеях в ОФС, относящихся к показателю качества «Безопасность», в качестве основных используемых методов указываются методы амплификации нуклеиновых кислот и иммунологические.

В ФСША 42-НФ 37, ЕФ 10.0 и ГФ РБ II содержатся ОФС, посвященные методам амплификации нуклеиновых кислот, ГФ РФ XIV содержит ОФС только об одном из них — ПЦР, ЯФ XVII не имеет отдельных статей по молекулярно-генетическим методам (они описываются в других ОФС по факту применения).

Методам амплификации нуклеиновых кислот в ФСША 42-НФ 37 посвящены шесть ОФС. В двух описываются: общее представление, перечень методов, основные термины, процедуры выделения и обработки нуклеиновых кислот. Отдельная ОФС посвящена амплификации, основным компонентам анализа, вариантам ПЦР, правилам их проведения и оптимизации, а также обеспечению качества. По смыслу вышеописанные ОФС совпадают с текстами из ГФ РФ XIV, ЕФ 10.0 и ГФ РБ II. Далее только в ФСША 42-НФ 37 представлены ОФС с информацией о микрочипах и методах генотипирования (метод коротких tandemных повторов, пиросеквенирование и др.). Последняя ОФС посвящена методам определения остаточной ДНК. В России представлен проект такой ОФС. Согласно текстам обеих статей, приемлемым считается содержание остаточной ДНК не более 10 нг на дозу.

ОФС, посвященные иммунологическим методам, представлены во всех фармакопеях без исключения, при этом в ГФ РФ XIV и ЯФ XVII описан только один из них — ИФА. Как и в случае с методами амплификации нуклеиновых кислот, в ФСША 42-НФ 37 представлены несколько ОФС по иммунологическим методам. Отдельно представлена информация об общем описании и видах иммунологических методов (ИФА, вестерн-блот и др.). Эта ОФС аналогична ОФС ЕФ 10.0 и ГФ РБ II, другая ОФС — об ИФА, информация о котором совпадает в статьях ФСША 42-НФ 37, ГФ РФ XIV и ЯФ XVII. Также есть статья, посвященная иммуноблоту, который в зависимости от наличия или отсутствия электрофоретического разделения можно разделить на вестерн-блот и слот/дот-блот. В ГФ РФ XIV также присутствует ОФС с описанием вестерн-блота.

Подлинность, активность клеточной линии

Для изучения подлинности и активности КЛ используются описанные выше методы амплификации нуклеиновых кислот и иммунологические, а также проточная цитометрия, подробное описание которой представлено в отдельной ОФС во всех фармакопеях (в России — проект ОФС), кроме ЯФ XVII. Как и в случае с методами амплификации нуклеиновых кислот, в ЯФ XVII упоминается данный метод только по факту применения в других ОФС. Все фармакопеи приводят технические аспекты метода, в том числе оборудование, подготовку образцов, их окрашивание и анализ данных. Помимо иммунофенотипирования указаны такие примеры применения проточной цитометрии, как количественное определение популяций клеток, анализ пролиферативной активности и другие функциональные анализы.

Жизнеспособность

Отдельная ОФС по контролю качества по показателю «Жизнеспособность» приведена только в ЕФ 10.0 и ГФ РБ II. Для определения количества жизнеспособных клеток используют методы ручного (гемоцитометр) и автоматического (счетчик клеток или проточная цитометрия) подсчета с применением метода окрашивания. Анализ жизнеспособности основан на проникновении красителя в мертвые или поврежденные клетки, жизнеспособные клетки остаются неокрашенными. При ручном подсчете наиболее часто используемым красителем является трипановый синий, при автоматическом — 7-аминоактиномицин D или пропидий-йодид, также в обоих случаях могут быть использованы другие подходящие красители.

Другие фармакопеи описывают оценку жизнеспособности в ОФС Проточная цитометрия.

pH

Если для продукта, содержащего КЛ, применимо измерение pH, должен быть указан диапазон допустимых значений, оцененный согласно ОФС, которые содержатся во всех рассмотренных фармакопеях.

Заключение

Проблема выбора и применения методов оценки качества КЛ, входящих в состав БМКП, является актуальной как для разработки, так и для проведения экспертизы качества БМКП вследствие отсутствия в настоящее время регламентирующего национального документа, подобного ГФ РФ XIV для ЛС. Однако, учитывая наличие опыта применения в Российской Федерации фармакопейных методов для оценки качества КЛ, являющихся субстратами для производства некоторых биологических лекарственных препаратов, некоторые ОФС (рассмотренные в данном обзоре) могут быть применены и для оценки качества КЛ человека, входящих в состав БМКП. В то же время существует и необходимость разработки ОФС (или аналогов ОФС) непосредственно для оценки качества БМКП и КЛ, входящих в их состав, в рамках проведения экспертизы качества. Рассмотренные подходы и методы оценки качества препаратов на основе клеток и тканей, содержащиеся в ОФС ФСША 42-НФ 37 и ЕФ 10.0, могут служить основой для разработки ОФС в России, например для определения подлинности, активности, вирусной безопасности и микоплазм в КЛ БМКП методами, основанными на амплификации нуклеиновых кислот.

Вклад авторов. *М. А. Водякова* — анализ и обобщение данных, изложенных в нормативных документах, написание, доработка текста; *А. Р. Сайфутдинова* — сбор и систематизация данных; *Е. В. Мельникова* — идея, концепция и дизайн исследования, обобщение результатов исследования; *Ю. В. Олефир* — интерпретация результатов исследования, окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. *Marina A. Vodyakova*—analysis and consolidation of data from regulatory documents, writing and revising the text; *Aliya R. Sayfutdinova*—collection and systematisation of data; *Ekaterina V. Melnikova*—elaboration of the idea, concept and design of the study, summarising the study results; *Yuri V. Olefir*—interpretation of the study results, final approval of the version for publication.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590045-2).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research

project No. 056-00003-20-00 and was supported by the FSBI "SCEEMP" of the Ministry of Health of Russia (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590045-2).

Конфликт интересов. Ю. В. Олефир является главным редактором журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Yuri V. Olefir is the Editor-in-chief of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

1. Ryan J. Endotoxins and cell culture. *Technical Bulletin*. USA: Corning; 2008.
2. Vodiakova MA, Sayfutdinova AR, Melnikova EV, Goryaev AA, Sadchikova NP, Gegechkori VI, et al. Production of biomedical cell products: requirements for the quality of donor material and excipients of animal origin (review). *RSC Med Chem*. 2020;11:349–57. <https://doi.org/10.1039/C9MD00529C>
3. Rheinwald JG, Green HA. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975;6(3):331–43. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(75\)80001-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(75)80001-8)

Об авторах / Authors

Водякова Марина Андреевна. *Marina A. Vodyakova.* ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6008-0554>

Сайфутдинова Алия Равилевна. *Aliya R. Sayfutdinova.* ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4735-7800>

Мельникова Екатерина Валерьевна, канд. биол. наук. *Ekaterina V. Melnikova, Cand. Sci. (Biol.).* ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9585-3545>

Олефир Юрий Витальевич, д-р мед. наук, ст. науч. сотр. *Yuri V. Olefir, Dr. Sci. (Med.), Senior Research Associate.* ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7652-4642>

Поступила 16.06.2020

После доработки 05.08.2020

Принята к публикации 28.08.2020

Received 16 June 2020

Revised 5 August 2020

Accepted 28 August 2020