

Особенности определения специфической активности биотехнологических лекарственных средств

Н. А. Алпатова, Л. А. Гайдерова, А. К. Яковлев, Е. В. Мотузова, С. Л. Лысыкова,
А. А. Солдатов, Ж. И. Авдеева

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила 04.10.2016 г. Принята к публикации 07.02.2017 г.

Обзор посвящен вопросам оценки специфической активности биотехнологических лекарственных средств, которая является одним из основных показателей их качества. Подходы к изучению данного показателя и выбор методик зависят от природы и свойств лекарственного препарата. Методики должны быть адекватными и обладать достаточной чувствительностью и специфичностью. Для оценки специфической активности указанной группы лекарственных препаратов могут быть использованы биологические методы исследования как в условиях *in vivo* на лабораторных животных, характеризующихся наиболее адекватным ответом на исследуемый препарат, так и в условиях *in vitro* с использованием чувствительных клеточных линий. Оценка специфической биологической активности позволяет охарактеризовать фармакологическое действие препарата и направленно изучить механизмы его терапевтических эффектов при клиническом применении. Поэтому специфическую активность биотехнологических препаратов предпочтительно оценивать с использованием методов, соответствующих предполагаемому механизму действия препарата. Для многих биотехнологических лекарственных средств, включая препараты системы цитокинов, МкАТ, белков слияния/фьюжен белков и др., используются индивидуальные методы оценки специфической активности. Биотехнологические лекарственные препараты успешно применяются для лечения заболеваний аутоиммунной природы, инфекционных, онкологических и аллергических заболеваний.

Ключевые слова: биотехнологические лекарственные препараты; цитокины; моноклональные антитела; специфическая биологическая активность; методы исследования в условиях *in vitro* и *in vivo*; линии клеток.

Библиографическое описание: Алпатова НА, Гайдерова ЛА, Яковлев АК, Мотузова ЕВ, Лысыкова СЛ, Солдатов АА, Авдеева ЖИ. Особенности определения специфической активности биотехнологических лекарственных средств. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(1): 13–26.

Биотехнологические лекарственные препараты занимают одно из ведущих мест на современном фармацевтическом рынке. Разработка новых лекарственных препаратов указанной группы является одним из перспективных направлений в области создания лекарственных средств для лечения тяжелых хронических прогрессирующих аутоиммунных, онкологических, инфекционных заболеваний в связи с их высокой специфичностью по отношению к факторам, связанным с патогенезом заболевания, что позволяет достигать высокой клинической эффективности.

Биотехнологические лекарственные препараты — лекарственные препараты, производство которых осуществляется с использованием биотехнологических процессов и методов (в том числе ДНК-рекомбинантной технологии, технологии контролируемой экспрессии генов, кодирующих биологически активные белки в прокариотах и эукариотах, включая измененные клетки млекопитающих), гибридного метода и метода моноклональных антител [1].

Действующим веществом в биотехнологических лекарственных препаратах являются белки, принадлежащие к различным группам биологически активных веществ — рекомбинантные цитокины человека, моноклональные антитела (МкАТ), белки слияния/фьюжен белки и др. Учитывая, что биотехнологические лекарственные средства являются сложными препаратами белковой природы, которые применяются для лечения хронических тяжело протекаю-

щих заболеваний, необходимо уделять особое внимание качеству лекарственных препаратов данной группы.

Оценка подлинности препарата, его физико-химических свойств, количественных характеристик и показателей чистоты (определение содержания родственных соединений и посторонних примесей, молекулярно-массовое распределение и др.) должна проводиться с использованием современных высокочувствительных физико-химических, иммунохимических, биохимических методов и высокотехнологичного оборудования. Однако на основании результатов оценки физико-химических показателей биотехнологических препаратов невозможно в полном объеме прогнозировать проявления их биологической активности и клинических эффектов при использовании в медицинской практике.

Целью настоящего обзора является анализ особенностей определения биологической активности различных групп биотехнологических лекарственных средств в зависимости от механизмов их действия.

Специфическая биологическая активность, т.е. специфическая способность препарата вызывать определенный биологический эффект, является одним из наиболее важных показателей качества биотехнологических лекарственных препаратов. Подходы к изучению данного показателя и выбор методик зависят от природы и свойств лекарственного препарата. Используют методики *in vitro* и *in vivo*, основанные на различных принципах, с помощью которых можно показать специфичность действия активного компонента лекарственного препарата. Методики должны

быть адекватными и обладать достаточной чувствительностью и специфичностью [2–5].

Точность результатов, полученных при определении специфической активности, — необходимое условие обеспечения качества лекарственных препаратов. В связи с этим, аналитические методики, используемые для оценки активности, должны быть откалиброваны/стандартизованы с использованием международного или национального стандартного образца. Если такие стандарты недоступны, должен быть разработан рабочий стандартный образец (стандартный образец предприятия) в соответствии с рекомендациями ВОЗ [2]. В настоящее время для многих рекомбинантных цитокинов человека разработаны Международные стандарты и стандарты Европейской фармакопеи как для оценки физико-химических свойств, так и для определения специфической активности.

Разработка отечественных стандартных образцов для оценки качества лекарственных средств является в настоящее время одной из приоритетных задач. В ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в рамках выполнения НИР «Совершенствование системы разработки и применения стандартных образцов, предназначенных для оценки качества, эффективности и безопасности лекарственных средств» разработан и аттестован отраслевой стандартный образец (ОСО) активности филграстима, проводятся исследования по аттестации ОСО активности эритропоэтина [6, 7].

Для препаратов на основе МкАТ и белков слияния Международные и фармакопейные стандартные образцы не разработаны, в этом случае производителем разрабатывается стандартный образец предприятия, который и используется при оценке качества каждого конкретного препарата.

Оценка специфической биологической активности позволяет охарактеризовать фармакологическое действие препарата и изучить механизмы его терапевтических эффектов при клиническом применении. Поэтому специфическую активность биотехнологических препаратов предпочтительно оценивать с использованием методов, соответствующих предполагаемому механизму действия препарата. Для многих биотехнологических лекарственных препаратов, включая препараты системы цитокинов, МкАТ и др., используются индивидуальные методы оценки специфической активности [3, 4].

Цитокины — белковые или полипептидные факторы, которые в основном продуцируются активированными клетками кроветворной и иммунной систем и опосредуют межклеточные взаимодействия при кроветворении, воспалении, иммунных процессах в организме. Они являются универсальными регуляторами жизненного цикла клеток, контролируют процессы дифференцировки, пролиферации, функциональной активации и апоптоза клеток. Одной из важнейших особенностей цитокинов является их способность влиять на все клетки организма, обеспечивая межклеточное взаимодействие и контроль внутренней среды [8, 9]. Система цитокинов включает клетки, продуцирующие цитокины, растворимые цитокины, клетки, экспрессирующие рецепторы для цитокинов (клетки-мишени), белки-антагонисты цитокинов или их рецепторов.

Активная продукция цитокинов происходит в ответ на воспалительные или антигенные стимулы. Действие цитокинов осуществляется через рецепторы, количество которых значительно увеличивается при активации клеток. Связывание цитокина со специфическим рецептором вызывает активацию клетки, пролиферацию, дифференци-

ровку или ее гибель. Знание природы таких рецепторов имеет значение для разработки препаратов, блокирующих эти рецепторы [8].

Цитокины подразделяются на несколько классов — интерлейкины (ИЛ), интерфероны (ИФН α , β , γ), факторы некроза опухолей (ФНО α , β), факторы роста гемопоэтических клеток (колониестимулирующие факторы (Г-КСФ, М-КСФ, ГМ-КСФ), эритропоэтин, тромбопоэтин и др.), факторы роста нелимфоидных клеток (фактор роста фибробластов, фактор роста эндотелиальных клеток, эпидермальный фактор роста и трансформирующие факторы роста (ТФР β , ТФР α)).

Интерлейкины — биологически активные вещества, являются главными участниками развития иммунного ответа на внедрение микроорганизмов, формирования воспалительной реакции, осуществления противоопухолевого иммунитета и др. Они подразделяются на провоспалительные и противовоспалительные, ростовые и дифференцировочные факторы лимфоцитов, хемокины, отдельные регуляторные цитокины [9].

Провоспалительные цитокины — ИЛ-1, ФНО α и ИЛ-6 являются главными медиаторами острой фазы реакции организма, развивающейся в процессе инфекционного заболевания или механического повреждения тканей.

Важным иммунорегуляторным цитокином, участвующим в развитии иммунного ответа и обладающим множеством системных эффектов, является ИЛ-1. Он играет существенную роль в активации Т-Лф, стимулируя продукцию ИЛ-2, активирует Th1 звено иммунного ответа. ИЛ-1 стимулирует выработку гепатоцитами белков острой фазы, при действии на центр терморегуляции гипоталамуса вызывает развитие лихорадки. Также ИЛ-1 стимулирует пролиферацию и дифференцировку различных типов клеток. Усиливая экспрессию рецепторов для колониестимулирующих факторов, ИЛ-1 способствует усилению гемопоэза, с чем связано его радиозащитное действие, стимулирует выход лейкоцитов из костного мозга [8–10] (рис. 1).

На основе рекомбинантного цитокина ИЛ-1b человека разработан отечественный лекарственный препарат «Беталейкин» (ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, С.-Петербург).

Фактор некроза опухолей альфа (ФНО α) — провоспалительный цитокин с широким спектром активности, является членом большого семейства молекул суперсемейства ФНО, к которому относят лимфотоксины α и β и др. Основные продуценты ФНО α как и ИЛ-1 — моноциты (Мо) и макрофаги (Мф). ФНО α усиливает экспрессию молекул адгезии, синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов, белков острой фазы и т.д. Наряду с ИЛ-1, ФНО α участвует в формировании всех основных местных, а также некоторых системных проявлений воспаления [8, 9].

ИЛ-6 является провоспалительным цитокином широкого действия, участвует в индукции практически всего комплекса местных проявлений воспаления. Однако его провоспалительные свойства выражены слабее, ИЛ-6 сочетает свойства про- и противовоспалительных цитокинов и участвует не только в развитии, но и в ограничении воспалительной реакции [8].

ИЛ-2 является специфическим ростовым фактором для Т-клеток. Продуцируемый активированными Т-Лф, ИЛ-2 выполняет ключевую роль в процессе инициации и развития иммунного ответа. Он стимулирует активацию Т-хелперов, цитотоксических Т-клеток, В-Лф, естественных (нормальных) киллеров (НК-клеток) и Мф. При стиму-

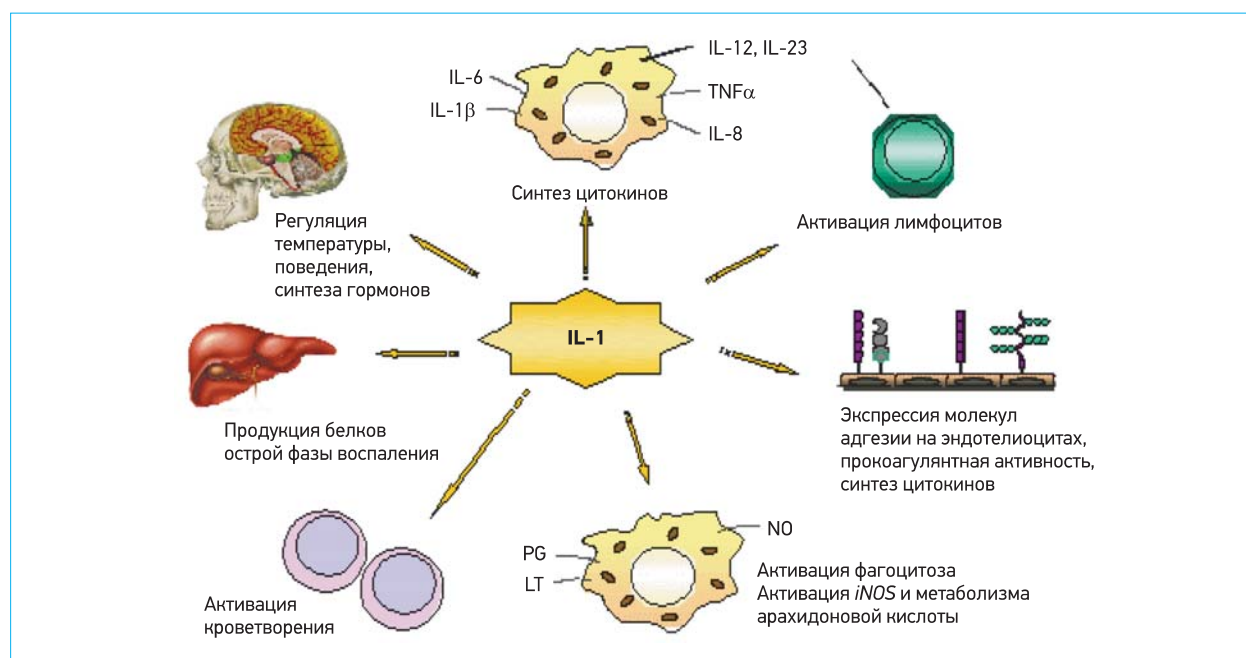


Рис. 1. Участие интерлейкина-1 в защитных реакциях организма: плейотропность эффектов [11].

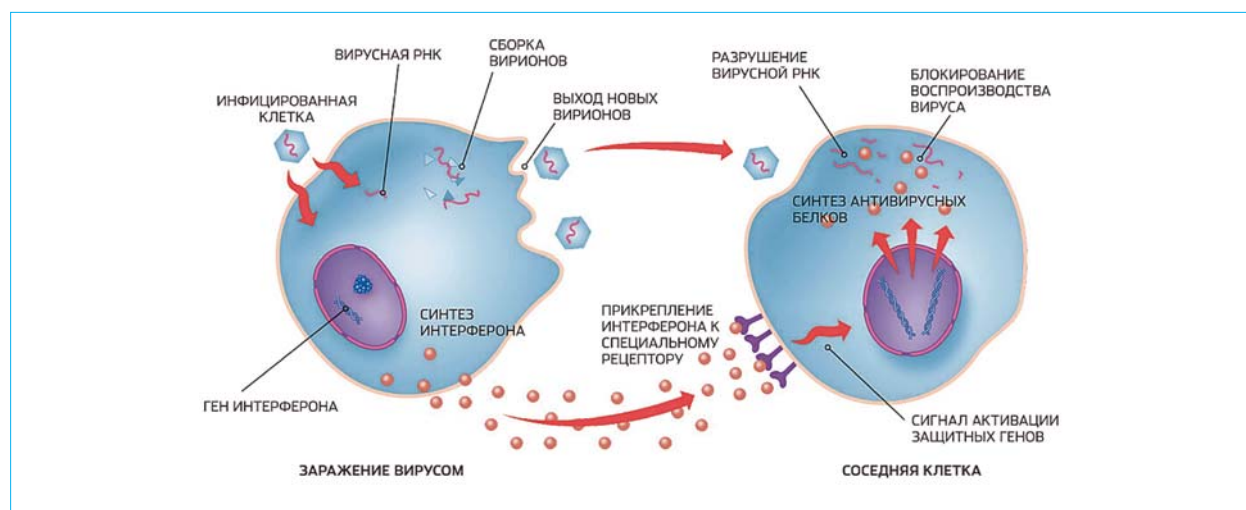


Рис. 2. Механизм действия интерферона [15].

ляции ИЛ-2 формируются лимфокин-активированные киллеры (ЛАК), обладающие высокой противоопухолевой активностью. От присутствия ИЛ-2 зависит развитие цитотоксической активности НК-клеток и цитотоксических Т-Лф [8, 9, 12, 13].

ИЛ-2 играет основную роль не только в клональной пролиферации активированных Т-Лф, но и является фактором их жизнеспособности, поскольку в отсутствие ИЛ-2 активированные клетки подвергаются апоптозу. На основе рекомбинантного белка ИЛ-2 человека разработаны лекарственные препараты — отечественный препарат Ронколейкин (ООО «НПК «БИОТЕХ», С.-Петербург) и зарубежный препарат Пролейкин (Альдеслейкин) («Cetus», США и «Chiron», Нидерланды).

Интерфероны (ИФН) — защитные вещества белковой природы, вырабатываемые клетками в ответ на вирусную инфекцию и другие стимулы, обладают противовирусной,

противоопухолевой, иммуномодулирующей активностью. Известно около 20 разновидностей ИФН, объединенных в 3 вида и 2 типа. Наиболее важное свойство ИФН — способность оказывать противовирусное действие. Противовирусная активность наиболее высока у ИФН типа I (α , ω , β), при этом ИФН не проникает в клетки, а взаимодействует с рецепторами на их поверхности. Далее происходит активация генов, кодирующих ферменты с прямым противовирусным действием, вызывающих блокаду синтеза белков и разрушение вирусной мРНК (рис. 2). Противовирусная активность ИФН типа III также сильно выражена, хотя и обусловлена другими механизмами и развивается несколько медленнее. Также подобно другим цитокинам, ИФН участвуют в регуляции иммунных процессов. Сочетание указанных свойств ИФН служит основанием для их широкого применения в качестве лекарственных препаратов [14].

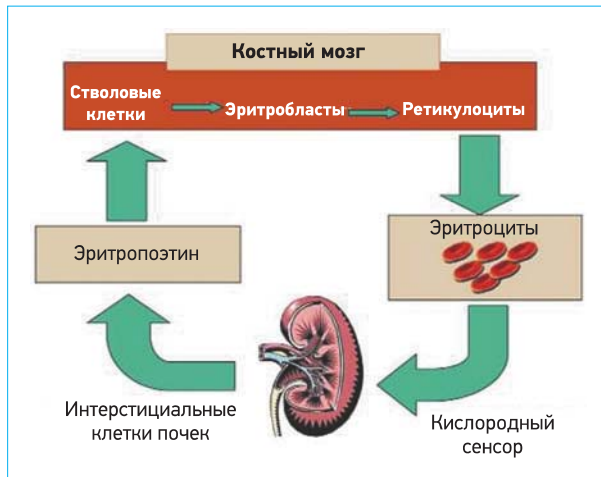


Рис. 3. Синтез и действие эритропоэтина [19].

К факторам гемопоэтических клеток, основной биологической функцией которых является поддержание жизнеспособности и пролиферации кроветворных клеток, относятся колониестимулирующие факторы, эритропоэтин, тромбопоэтин и др. Колониестимулирующие факторы (Г-КСФ, М-КСФ и ГМ-КСФ) продуцируются различными типами клеток, такими как эндотелиальные клетки, фибробласты, а также Мо/Мф и Т-Лф. Г-КСФ регулирует пролиферацию и дифференцировку клеток-предшественников в костном мозге и высвобождение нейтрофилов в периферической крови; является регулятором гранулопоэза, повышает эффекторные функции нормальных зрелых нейтрофилов. Свою активность Г-КСФ проявляет за счет связывания со специфическим трансмембранным рецептором, экспрессированным на различных гемопоэтических клетках. В клинической практике используются препараты Г-КСФ, полученные с использованием технологии рекомбинантной ДНК в системе клеток *Escherichia coli* (филграстим) или в системе клеток яичника китайского хомячка (СНО) (ленограстим) для лечения нейтропении после цитотоксической химиотерапии по поводу злокачественных заболеваний и др. [16].

Основным регулятором эритропоэза является эритропоэтин, он способствует пролиферации и дифференцировке клеток эритроидного ростка костного мозга, в организме человека в основном вырабатывается клетками почек [8, 9]. Главным фактором, регулирующим выработку эритропоэтина в организме, является гипоксия. Продукция эритропоэтина имеет обратную зависимость от парциального давления кислорода в крови [17, 18] (рис. 3).

Эритропоэтин является гетерогенным гликопротеином, состоящим из нескольких различных изоформ, образующихся преимущественно путем гликозилирования. В медицинской практике применяется 14 лекарственных препаратов на основе рекомбинантного эритропоэтина (эпоэтина) человека. Гликозилирование молекул рекомбинантного эритропоэтина приводит к образованию нескольких биологически активных форм с различной молекулярной массой и биологической активностью. В настоящее время существует девять международных непатентованных наименований (МНН) рекомбинантного эритропоэтина (эпоэтины альфа, бета, гамма, дельта, эпсилон, каппа, омега, тета и дзета) [17, 18].

Для оценки специфической активности препаратов системы цитокинов могут быть использованы биологиче-

ские методы исследования как в условиях *in vivo* на лабораторных животных, характеризующихся наиболее адекватным ответом на исследуемый препарат, так и в условиях *in vitro* с использованием клеточных линий, чувствительных к определенному цитокину. В зависимости от основных биологических свойств цитокинов и их механизмов действия на клетки-мишени, специфическая активность указанной группы препаратов может оцениваться по стимуляции пролиферации клеток-мишеней, цитотоксическому эффекту, индукции дифференцировки костномозговых предшественников, противовирусному действию [5, 20].

Метод определения пролиферативной активности клеток является одним из наиболее часто используемых методов оценки специфической биологической активности лекарственных препаратов цитокинов. В данном тесте используются соответствующие линии клеток, рост и пролиферация которых зависит от присутствия цитокина в среде культивирования и обусловлена его взаимодействием со специфическими рецепторами на их поверхности. В настоящее время большое количество клеточных линий, чувствительных к различным цитокинам человека, присутствует в каталогах международных и отечественных коллекций клеточных культур.

Разновидности указанного метода определяются стимулирующим или ингибирующим действием препарата на уровень пролиферации, видом используемой клеточной культуры, способом детекции результатов. Методы оценки влияния изучаемого препарата на жизнеспособность и пролиферацию клеток, а также на различные метаболические процессы основаны на определении количественного содержания бластных клеток по включению радиоактивной или другой метки в пролиферирующие клетки; использовании витальных или флуоресцентных красителей, с помощью МТТ-теста, ХТТ-теста и т.д. [20, 21] (табл. 1).

Как видно из данных, представленных в таблице 1, для оценки специфической активности препаратов цитокинов используют методы исследования как в условиях *in vitro*, так и в условиях *in vivo*, в частности для препаратов на основе филграстима или эритропоэтина. Гемостимулирующую активность филграстима оценивают на модели индуцированной цитостатической миелосупрессии, определяя количественное содержание лейкоцитов и нейтрофилов у животных с иммуносупрессией после введения филграстима. Активность эритропоэтина оценивают по стимулирующему влиянию на эритропоэз у соответствующих линий нормоцитемических мышей, определяя количество ретикулоцитов после введения препаратов.

Специфическую противовирусную активность лекарственных препаратов на основе ИФН определяют по их защите чувствительных культур клеток от цитопатического действия вирусов-индикаторов.

Специфическая активность ФНО α может быть оценена по цитолитическому действию на чувствительные к нему линии клеток (например, клеток фибробластов мышечной линии L-929, клеток фибросаркомы WENI-164). Оценка результатов проводится по уровню сохранения жизнеспособности клеток, учитываемой по включению метки, аналогично определению уровня пролиферации клеток.

В клинической практике выделяют основные направления использования цитокинов — цитокиновая иммунотерапия, при которой цитокины выступают в роли лекарственных средств; антицитокиновая терапия, направленная на блокирование биологического действия или удаление избытка цитокинов из организма. Цитокинотерапия мо-

Таблица 1. Лекарственные препараты на основе рекомбинантных цитокинов человека

Группа лекарственных препаратов на основе цитокинов	Показания для клинического применения	Биологическое действие	Метод определения специфической активности
Колонистимулирующие факторы – Г-КСФ (филграстим, ленограстим), – ГМ-КСФ (молграмостим), – М-КСФ	Стимуляция лейкопоза для восстановления нормального числа лейкоцитов, сниженного после химиотерапии у онкологических больных	Стимуляция пролиферации, дифференцировки и функциональной активности гемопоэтических клеток, активация процессов кроветворения, регуляция гранулопоза	Гемостимулирующая активность (<i>in vivo</i>) на модели цитостатической миелосупрессии; Стимулирующее действие на пролиферацию (<i>in vitro</i>) – клеток костного мозга, – клеток миелолейкоза мышей, – клеток эритролейкемии, чувствительных к ГМ-КСФ
Эритропоэтины эпоэтины – альфа, – бета, – каппа, – тета, – зета и др.	Лечение анемии различного генеза (больные с хронической почечной недостаточностью, онкологические больные)	Стимуляция эритроидного роста костного мозга	Стимуляция эритропоза у мышей (<i>in vivo</i>); Стимуляция пролиферации чувствительных клеток (<i>in vitro</i>)
Интерлейкины – ИЛ-1 бета (Беталейкин) – ИЛ-2 (Ронколейкин)	ИЛ-1 бета — стимулятор лейкопоза при токсической лейкопении – средство экстренной противолучевой терапии – вторичные иммунодефицитные состояния ИЛ-2 — – сепсис – иммунодефицитные состояния – инфекционные заболевания – плоскоклеточный рак почки	Провоспалительное действие, стимуляция кроветворения Влияние на рост, дифференцировку и активацию Мф, Т- и В-Лф, повышение активности натуральных киллеров и цито-токсических Т-Лф	Усиление пролиферации тимоцитов мышей , стимулированных субоптимальной дозой митогена (<i>in vitro</i>) Стимуляция пролиферации линии клеток CTLL-2, зависимой от присутствия ИЛ-2 (<i>in vitro</i>)
Интерфероны α-лейкоцитарный β-фибробластный γ-иммунный	Использование в терапии различных вирусных инфекций и онкологических заболеваний	Наличие противовирусной активности, участие в регуляции иммунных процессов	Оценка противовирусного действия (<i>in vitro</i>) на чувствительных к данному типу ИФН линиях клеток (A-549, MDBK, Vero и др.), с использованием соответствующего вируса-индикатора (вирусы везикулярного стоматита, энцефаломиокардита мышей)
Эпидермальный фактор роста (ЭФР)	При синдроме диабетической стопы у пациентов с трофическими и невропатическими язвами 3 и 4 степени	Стимуляция пролиферации фибробластов, кератиноцитов, эндотелиальных и других клеток, участвующих в заживлении ран	Стимуляция пролиферации линии клеток, чувствительных к фактору роста

жет использоваться как самостоятельный метод лечения или входить в состав комплексной терапии ряда заболеваний [8].

МкАТ представляют собой относительно новую группу лекарственных препаратов, успешно применяемых при лечении онкологических, аутоиммунных, инфекционных, аллергических и ряда других заболеваний. Терапия с помощью препаратов МкАТ высокоспецифична и эффективна, поскольку направлена на определенные патогенетически значимые механизмы развития заболевания, которые ранее не удавалось контролировать с помощью фармакологических средств [8, 22, 23]. Использование лекарственных препаратов МкАТ в качестве терапевтических агентов явилось для медицины стратегическим этапом в смене концепции лечения — от неспецифической к специфической (таргетной) терапии [24].

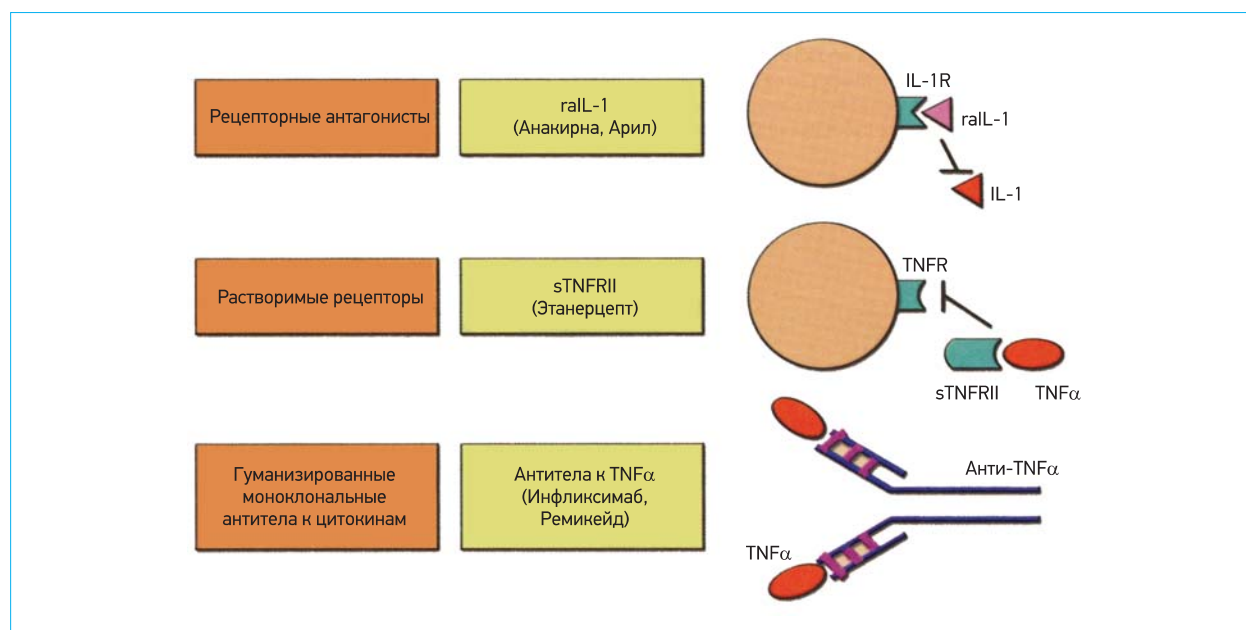
С каждым годом на фармацевтическом рынке увеличивается количество лекарственных препаратов МкАТ и расширяется диапазон их клинического применения. Разработка новых препаратов позволяет ожидать появления в ближайшем будущем еще более разнообразных и эф-

фективных лекарственных средств на основе модифицированных МкАТ или их производных [25].

При оценке специфической активности препаратов МкАТ, определяющей их клиническую эффективность, используют методы, соответствующие предполагаемому механизму действия МкАТ, воспроизводимые в условиях *in vitro*. Направленность действия МкАТ осуществляется за счет использования лиганд-опосредованного механизма, который способствует связыванию препарата с соответствующими антигенами (АГ) на поверхности клеток. В связи с этим, в методиках определения специфической активности необходимо использование клеточных линий, которые несут на своей поверхности соответствующие опухоле-ассоциированные АГ (различные культуры опухолевых тканей человека); экспрессируют рецепторы к ростовым факторам и биологически активным цитокинам, а также иные мембранные молекулы, на которые направлены МкАТ. Все большее распространение получают линии клеток, трансфицированные геном люциферазы, которая может использоваться для оценки уровня АТФ в клетках, что позволяет оценить жизнеспособность или

Таблица 2. Механизм действия МкАТ и методы оценки их специфической активности [8, 25, 26]

Механизм действия моноклональных антител	Метод оценки специфической активности
Иммуноопосредованная (антитело- и комплементзависимая цитотоксичность)	1) Оценка комплементзависимой цитотоксичности — происходит активация комплемента, обусловленная реакцией АГ-АТ, которая приводит к повреждению клеточной мембраны и гибели клетки
Стимуляция фагоцитоза опухолевых клеток	2) Оценка антителозависимой цитотоксичности — разрушение клеток-мишеней происходит под воздействием эффекторных клеток в присутствии специфических антител
Блокада рецепторов факторов роста	3) Оценка активности люциферазы, вырабатываемой клетками, рост и пролиферация которых зависит от присутствия факторов роста
Торможение роста опухоли за счет подавления пролиферации эндотелиальных клеток сосудов	4) Оценка ингибции пролиферации клеток, обусловленной нейтрализацией активности цитокина, от присутствия которого зависит рост и пролиферация исследуемых клеток
Ингибция проявлений биологически активных цитокинов	5) Оценка нейтрализации цитопатогенного действия цитокинов с помощью исследуемых специфических МкАТ
Индукция апоптоза	

**Рис. 4.** Средства антицитокиновой терапии и принципы их использования при системных воспалительных процессах [27]: raIL-1 — рецепторный антагонист интерлейкина 1; IL-1R — рецептор к интерлейкину 1; TNFα — фактор некроза опухолей альфа; sTNFRII — растворимый рецептор к фактору некроза опухолей альфа II типа.

активность клеток. При увеличении в культуре количества жизнеспособных клеток возрастает количество АТФ и добавление к клеткам субстрата люциферина способствует повышению уровня люминесценции, опосредованного взаимодействием фермента с люциферинном и АТФ (кофактор реакции).

В связи с высокой избирательностью и специфичностью действия на определенные звенья патогенеза заболевания, МкАТ в минимальной степени затрагивают процессы нормального функционирования иммунной системы и обладают способностью подавлять системные реакции воспаления при аутоиммунных заболеваниях и активировать иммунную систему при новообразованиях [26].

Для лечения аутоиммунных заболеваний широко используются лекарственные препараты МкАТ, действие которых направлено на подавление активности провоспалительных цитокинов. При системных воспалительных заболеваниях аутоиммунной природы наблюдается избыточная продукция провоспалительных цитокинов (ФНОα, ИЛ-1 и ИЛ-6), при этом их концентрация в сыворотке кро-

ви значительно повышается. Это сопровождается проявлением системных эффектов провоспалительных цитокинов, поскольку они являются главными медиаторами острой фазы реакции организма, обладают пирогенным эффектом, способны вызывать синдром повышения проницаемости капилляров.

Лекарственные препараты, направленные на ослабление действия биологически активных цитокинов, могут реализовать свое действие на разных уровнях: подавлять синтез или секрецию цитокина, связывать секретированный цитокин, конкурировать с ним за взаимодействие с рецептором на клетке-мишени и блокировать передачу сигнала с цитокинового рецептора в клетку-мишень [8, 27].

На рисунке 4 представлена схема механизмов действия указанных групп лекарственных препаратов.

Наиболее важной мишенью для антицитокиновой терапии является ФНОα. К препаратам, обнаружившим высокую эффективность при лечении ревматоидного артрита, псориаза, анкилозирующего спондилита, относятся

Таблица 3. Лекарственные препараты, нейтрализующие действие провоспалительных цитокинов

Лекарственный препарат	Показания для клинического применения	Биологическое действие	Метод определения специфической активности
Инфликсимаб химерные МкАТ к ФНО α Адалимумаб полностью человеческие МкАТ к ФНО α Голиумаб полностью человеческие МкАТ к ФНО α Этанерцепт белок слияния (рецептор к ФНО α и Fc-фрагмент IgG1 человека)	Ревматоидный артрит Болезнь Крона Псориатический артрит Псориаз Ревматоидный артрит Псориатический артрит Ювенильный идиопатический артрит	Нейтрализация биологического действия ФНО α и других, связанных с ним провоспалительных цитокинов	Нейтрализация цитолитического действия ФНО α на клетках линий чувствительных к ФНО α (WEHI 164 var 13, WEHI-164, L-929) (<i>in vitro</i>) Подавление биологической активности ФНОα, оцениваемой по ингибции апоптоза клеток, индуцированного ФНО α (<i>in vitro</i>)
Тоцилизумаб гуманизированные МкАТ к рецептору ИЛ-6	Ревматоидный артрит	Связывание растворимых и мембранных рецепторов ИЛ-6 (sIL-6R и mIL-6R)	Подавление пролиферации клеток линии, чувствительной к ИЛ-6 (<i>in vitro</i>)
Канакинумаб полностью человеческие МкАТ к ИЛ-1 β	Острый подагрический артрит Активная фаза системного ювенильного идиопатического артрита у детей	Связывание ИЛ-1 β , нейтрализация его биологического действия за счет блокады взаимодействия ИЛ-1 β с его рецепторами	Подавление ИЛ-1β зависимой индукции люциферазной активности клеток соответствующей линии (<i>in vitro</i>)

блокаторы ФНО α или его рецепторов [28, 29]. МкАТ к ФНО α связывают как растворимые, так и трансмембранные формы ФНО α и препятствуют их взаимодействию со специфическим рецептором на мембране клеток-мишеней. В медицинской практике для лечения указанных заболеваний используются лекарственные препараты — инфликсимаб, адалимумаб, голиумаб (МкАТ к ФНО α); белок слияния этанерцепт, включающий рецептор к ФНО α и Fc-фрагмент IgG1 человека. Также при лечении ревматоидного артрита применяются МкАТ к рецептору ИЛ-6 (тоцилизумаб), при лечении острого подагрического артрита — МкАТ к ИЛ-1 β (канакинумаб) (табл. 3).

Для оценки специфической активности данной группы препаратов используют следующие методы: нейтрализация цитолитического действия ФНО α на чувствительных линиях клеток; подавление пролиферации клеток, чувствительных к ИЛ-6.

В основе механизмов действия другой группы лекарственных препаратов лежит их способность оказывать модулирующее влияние на костимулирующие сигналы в процессе развития иммунного ответа. Известно, что для активации цитотоксических клеток / Т-Лф необходимо взаимодействие рецептора Т-клеток с АГ в комплексе с антигенами главного комплекса гистосовместимости (АГ ГКГ) класса II. Кроме активирующего сигнала нужны костимулирующие сигналы для индукции пролиферации Т-клеток, секреции цитокинов, проявления эффекторных функций и активации цитотоксических Т-Лф. Костимулирующие сигналы возникают благодаря взаимодействию маркера ранней активации CD28 на Т-Лф с костимулирующими молекулами CD80 и CD86 на антигенпрезентирующих клетках (АПК). Взаимодействие маркера поздней активации цитотоксических CTLA-4 на Т-Лф с CD80 и CD86 на АПК приводит к регулированию и подавлению активации Т-Лф [8].

Лекарственные препараты (абатацепт, белатацепт), активным компонентом которых является рекомбинантный белок слияния, состоящий из домена CTLA-4 и Fc-фрагмента IgG1 человека, взаимодействуя с костиму-

лирующими молекулами CD80 и CD86 на АПК, блокируют избыточную стимуляцию Т-Лф, осуществляемую за счет CD28 (рис. 5). Указанные препараты используются для лечения аутоиммунной патологии, при трансплантации органов для предотвращения реакции отторжения (табл. 4).

Лекарственный препарат на основе МкАТ к антигену CTLA-4 (ипилиумаб) применяется для лечения онкологических заболеваний, так как блокада CTLA-4 специфическими МкАТ приводит к подавлению супрессирующих сигналов, следствием чего является активация цитотоксических Т-Лф, за счет воздействия которых отмечается подавление роста опухолевых клеток [31, 32].

Специфическая активность указанных лекарственных препаратов оценивается по подавлению синтеза ИЛ-2 в культуре клеток или оценке степени активации Т-Лф при совместном культивировании Т- и В-клеток.

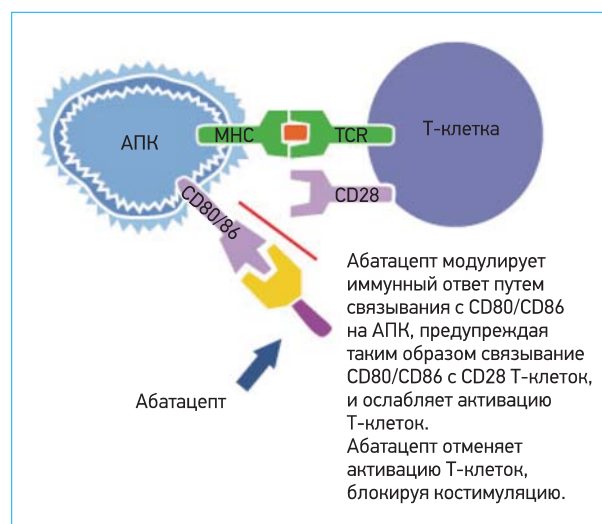
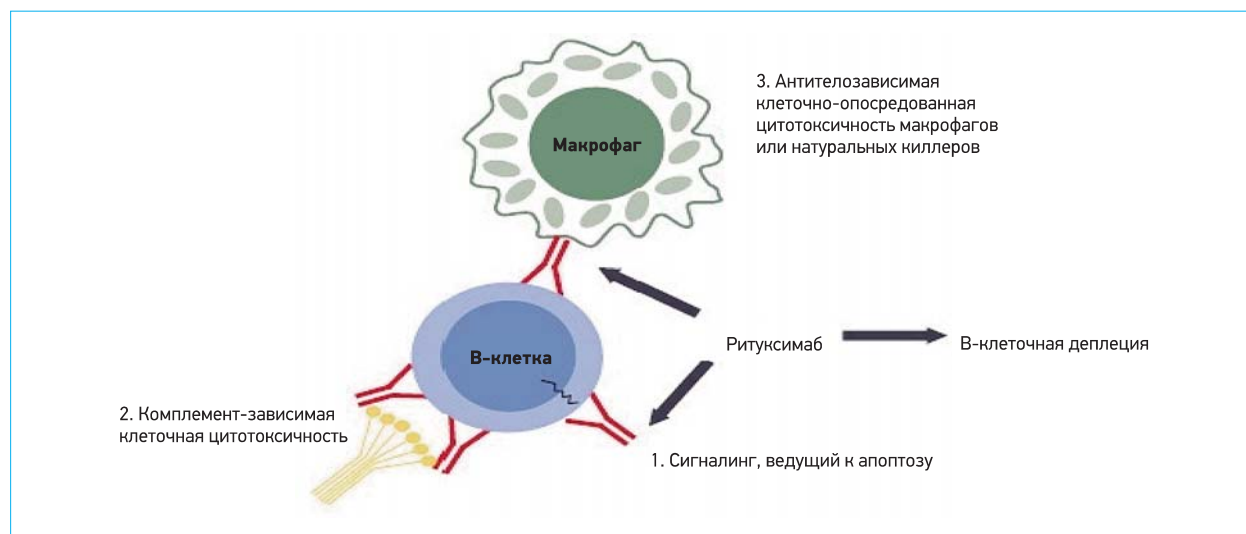


Рис. 5. Механизм действия абатацепта [30]: TCR — Т-клеточный рецептор; MHC — главный комплекс гистосовместимости; АПК — антигенпрезентирующие клетки.

Таблица 4. Лекарственные препараты, модулирующие костимулирующие сигналы

Лекарственный препарат	Показания для клинического применения	Биологическое действие	Метод определения специфической активности
Абатацепт Белатацепт рекомбинантный белок слияния (внеклеточный домен CTLA-4 и Fc-фрагмент IgG1 человека) Ипилимуаб полностью человеческие МкАТ к антигену CTLA-4 человека	Аутоиммунная патология Профилактика реакции отторжения трансплантата Лечение онкологических заболеваний	Подавление активации Т-Лф за счет блокады взаимодействия CD28 с CD80/CD86 (ингибция костимулирующего сигнала) Созревание цитотоксических Т-Лф за счет связывания антигена CTLA-4 повышает интенсивность иммунного ответа против опухолевых клеток	Ингибирование синтеза ИЛ-2 при совместном культивировании Т- и В-клеток человека (<i>in vitro</i>) Оценка степени активации Т-клеток (<i>in vitro</i>)

**Рис. 6.** Механизмы возможного действия ритуксимаба [30, 34, 35].

Наиболее широко лекарственные препараты МкАТ применяются в онкологии. Разработан целый ряд препаратов МкАТ, направленных к различным опухолеассоциированным АГ [33]. При лечении лейкозов используют препараты, активным компонентом которых являются МкАТ к мембранным молекулам, характерным для клеток, вовлеченных в лейкозный процесс. В этом случае специфическое связывание МкАТ с трансмембранным антигеном CD20 на опухолевых В-клетках способствует элиминации клеток за счет комплементзависимого цитолиза или антителозависимого контактного цитолиза. Регионы АТ, ответственные за распознавание АГ, связываются с CD20 на опухолевой В-клетке, а Fc-регионы путем связывания с первым компонентом комплемента или Fc-рецепторами на эффекторных клетках инициируют иммунные механизмы разрушения клетки (рис. 6).

Лекарственные препараты на основе МкАТ, специфичных к CD20 (ритуксимаб, обинутузумаб, офатумумаб), используются при лечении неходжкинской лимфомы и хронического лимфолейкоза, а также ревматоидного артрита, поскольку в настоящее время доказана возможность эффективного контроля аутоиммунных патологических состояний путем истощения (и/или модуляции функции) активированных В-клеток [21, 36–39]. Специфическая активность препаратов данной группы оценивается биологическими методами *in vitro*: метод комплементзависимой цитотоксичности с использованием В-лимфобластоидных клеток линии WIL2-S, экспрессирующих CD20;

метод антитело-зависимой цитотоксичности с использованием клеток, экспрессирующих CD20, и клеток-эффекторов (табл. 5).

Важными факторами функционирования клеток, в том числе опухолевых, являются регуляция процессов сигнальной трансдукции, включая активность факторов роста, транскрипционных факторов и тесно связанных с ними процессов клеточной пролиферации, ангиогенеза, а для опухолевых клеток — инвазии и метастазирования [40].

Факторы роста обеспечивают и регулируют рост, дифференцировку и функциональную активность клеток. К факторам роста, играющим важную роль в опухолевых процессах, относятся эпидермальный фактор роста (ЭФР), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов и др. [8–10].

Одним из наиболее изученных противоопухолевых препаратов МкАТ является трастузумаб (гуманизированные МкАТ к внеклеточному домену рецептора эпидермального фактора роста 2 типа (HER2)). Гиперэкспрессия указанного рецептора на поверхности опухолевых клеток связана с неблагоприятным течением заболевания. Поэтому он является важной мишенью для противоопухолевой терапии. Трастузумаб обладает комплексным механизмом противоопухолевого действия, который обусловлен блокадой внутриклеточных путей передачи сигнала, которые запускает HER2, а также стимуляцией противоопухолевого иммунного ответа. Он подавляет пролифера-

Таблица 5. Лекарственные препараты моноклональных антител, специфичных к CD20

Лекарственный препарат	Показания для клинического применения	Биологическое действие	Метод определения специфической активности
Ритуксимаб химерные МкАТ к молекуле CD20 на В-Лф и опухолевых клетках	Неходжкинская лимфома Ревматоидный артрит Хронический лимфолейкоз Хронический лимфолейкоз	Специфическое связывание МкАТ с CD20 В-Лф приводит к элиминации клеток	Комплементзависимая цитотоксичность с использованием В-лимфобластоидных клеток, экспрессирующих CD20 (<i>in vitro</i>)
Офатумумаб полностью человеческие МкАТ к молекуле CD20			Антитело-зависимая цитотоксичность с использованием клеток, экспрессирующих CD20 , и клеток-эффекторов (<i>in vitro</i>)
Обинутуумаб гуманизированные МкАТ II типа к молекуле CD20 с модифицированной схемой гликозилирования			

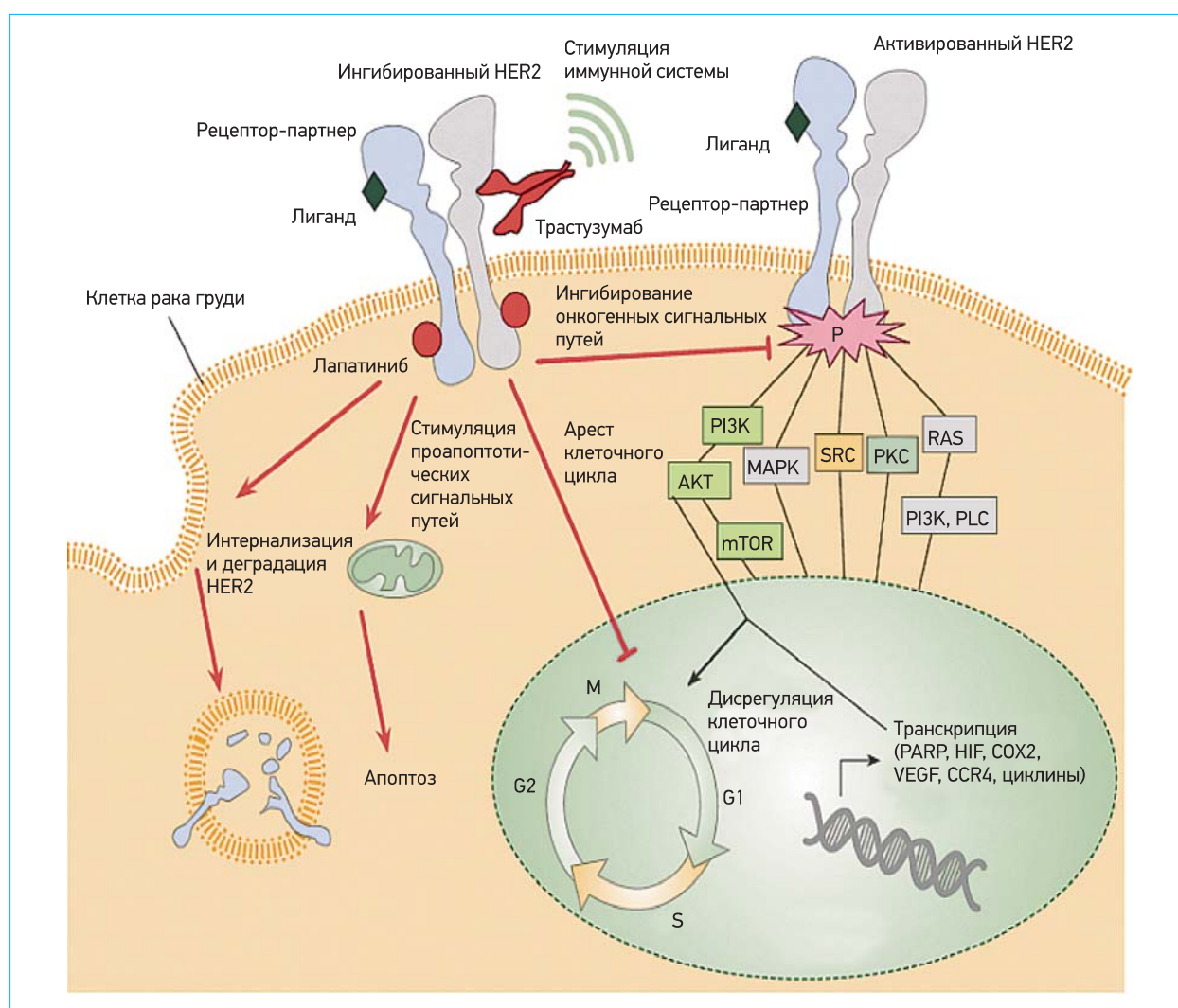


Рис. 7. Механизм действия трастузумаба [41, 44]: HER2 — внеклеточный домен рецептора эпидермального фактора роста 2 типа.

цию, восстанавливает способность опухолевых клеток к апоптозу и др. [41] (рис. 7).

В комбинации с пертузумабом (гуманизированные МкАТ к домену димеризации рецептора HER2) клиническая эффективность трастузумаба значительно повышается. Считается, что механизмы действия трастузумаба и пертузумаба дополняют друг друга, так как оба препарата связываются с HER2-рецептором, но в разных областях [41–43].

Специфическая активность указанных препаратов оценивается по их антипролиферативному действию на культурах клеток карциномы молочной железы человека (табл. 6).

Одним из основных факторов микроокружения опухоли, приводящим к росту и метастазированию заболевания, является ангиогенез. Взаимодействие фактора роста эндотелия сосудов с его рецепторами приводит к пролиферации эндотелиальных клеток и образованию новых

Таблица 6. Лекарственные препараты, подавляющие активность факторов роста

Лекарственный препарат	Показания для клинического применения	Биологическое действие	Метод определения специфической активности
Трастузумаб гуманизированные МкАТ к внеклеточному домену рецептора HER2	Диссеминированный рак молочной железы с гиперэкспрессией HER2	Связывание с IV доменом HER2-рецептора, блокирует HER2-опосредованные сигнальные пути, активирует клеточную цитотоксичность	Подавление пролиферации клеток линий карциномы молочной железы человека (<i>in vitro</i>)
Пертузумаб гуманизированные МкАТ к домену димеризации рецептора HER2	Метастатический или местнорецидивирующий неоперабельный рак молочной железы с гиперэкспрессией HER2	Связывание с доменом димеризации блокирует гиперактивацию сигнальных путей, опосредованных как через HER2, так и через рецепторы HER1/3/4	
Бевацизумаб гуманизированные МкАТ к VEGF	Метастатический колоректальный рак Местно рецидивирующий или метастатический рак молочной железы Распространенный и/или метастатический почечно-клеточный рак Глиобластома Эпителиальный рак яичника, маточной трубы и первичный рак брюшины	Связывание с VEGF предотвращает его взаимодействие с рецепторами на поверхности эндотелиальных клеток сосудов, подавляя их рост	Подавление пролиферации эндотелиальных клеток пупочной вены человека, экспрессирующих рецептор к VEGF (<i>in vitro</i>)
Афлиберцепт (рекомбинантный белок слияния) содержит домен рецептора VEGF и Fc-фрагмент IgG1 человека	Метастатический колоректальный рак (для лекарственного препарата «Залтрап®») В офтальмологии (для лекарственного препарата «Эйлеа®») – неоваскулярная (влажная) возрастная макулярная дегенерация – макулярный отек вследствие окклюзии центральной вены сетчатки	Связывание со всеми формами VEGF (VEGF-A, VEGF-B), блокирует активацию рецепторов к VEGF и пролиферацию эндотелиальных клеток	Снижение активности люциферазы, вырабатываемой клетками (линия клеток, рост и пролиферация которой зависит от VEGF) (<i>in vitro</i>)
Рабинизумаб Fab-фрагмент человеческого МкАТ к VEGF A	Экссудативно-геморрагическая форма возрастной макулярной дегенерации и отек макулы на фоне сахарного диабета и тромбоза вен сетчатки	Обладает антиангиогенным эффектом за счет связывания с эндотелиальным фактором роста сосудов. Это подавляет пролиферацию сосудов и неоваскуляризацию	Подавление пролиферации эндотелиальных клеток пупочной вены человека, экспрессирующих рецептор к VEGF (<i>in vitro</i>)

кровеносных сосудов. Специфическое связывание соответствующих МкАТ с VEGF предотвращает его взаимодействие с рецепторами на поверхности клеток эндотелия опухолевых клеток, что приводит к снижению васкуляризации опухоли и угнетению ее роста (рис. 8).

Для лечения онкологических заболеваний используются лекарственные препараты МкАТ — бевацизумаб (МкАТ к VEGF), панитумумаб (МкАТ к рецептору VEGF); препарат на основе белка слияния — афлиберцепт, который содержит в своей структуре домены рецепторов VEGF и

Fc-фрагмент IgG1 человека. Лекарственные препараты на основе Fab-фрагмента человеческого МкАТ к фактору роста эндотелия сосудов А (рабинизумаб), а также афлиберцепт применяются в офтальмологии для лечения неоваскулярной (влажной) формы возрастной макулярной дегенерации.

Специфическую активность указанных препаратов оценивают по подавлению пролиферации эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC, экспрессирующих рецептор к VEGF, или по снижению активности люциферазы, вырабатываемой клетками в ответ на стимуляцию VEGF (табл. 6).

Индукцированный различными стимуляторами, митогенами синтез цитокинов отражает потенциальную, резервную способность клеток отвечать на антигенный стимул (в частности, на действие лекарственных препаратов). Сниженная индуцированная продукция цитокинов может служить одним из признаков иммунодефицитного состояния.

У лекарственных препаратов с иммуномодулирующей активностью, а также многих препаратов МкАТ, специфическая активность может быть определена по их влиянию на активацию клеток, оцениваемую по способности клеток продуцировать цитокины (например, такие как ИЛ-2, ФНО α и др.). Для препаратов МкАТ, в соответствии с их механизмом действия, в данном случае характерно подав-

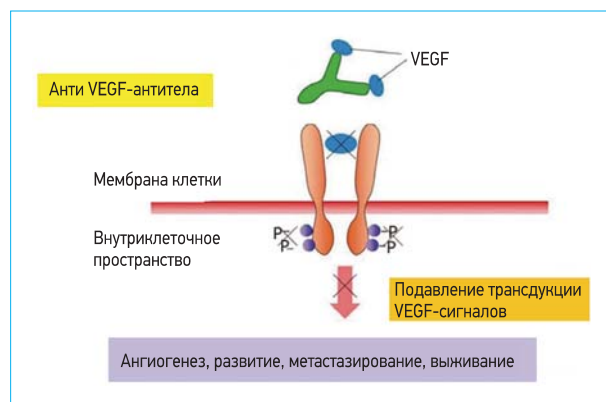


Рис. 8. Действие VEGF и результаты блокирования его активности с помощью моноклональных антител [45].

ление активации клеток и дозозависимое снижение уровня синтезируемых цитокинов.

Для выявления синтезированных цитокинов в супернатанте культивируемых клеток или цитокин-продуцирующих клеток используют методы, основанные на следующих принципах:

- выявление цитокинов (внутриклеточных и мембраноассоциированных) соответствующими МкАТ, меченными флуорохромами, путем регистрации клеток, экспрессирующих цитокины, на проточном цитофлуориметре;
- выявление клеток, секретирующих определенные цитокины (метод EliSpot);
- оценка интенсивности пролиферации соответствующих цитокин-зависимых клеточных линий под влиянием цитокинов, содержащихся в супернатанте культивируемых клеток;
- иммуоферментный анализ для выявления секретируемых цитокинов [25].

При оценке качества биотехнологических лекарственных препаратов также применяются методы, характеризующие специфичность связывания АГ с соответствующими АТ. С этой целью могут быть использованы методы иммуоферментного анализа (ИФА), поверхностного плазмонного резонанса, а также методы, основанные на технологии Alpha (AlphaScreen®, AlphaLISA® и AlphaPlex™) и др. Метод поверхностного плазмонного резонанса позволяет оценить биоспецифичное связывание иммобилизованного АТ с соответствующим АГ при их взаимодействии на биосенсорном чипе по изменению показателя преломления электромагнитной волны. Технология Alpha представляет собой люминесцентную технологию, основанную на взаимодействии частиц (гранул), разработанную для измерений биологических взаимодействий. Следует учитывать, что указанные методы не характеризуют проявления биологической активности лекарственных препаратов.

Таким образом, биотехнологические препараты в настоящее время достаточно широко применяются в медицинской практике. Одним из основных показателей, характеризующих качество лекарственных средств, является специфическая активность, позволяющая оценить способность препарата проявлять определенный биологический эффект. Охарактеризованные в обзоре методы исследования в условиях *in vivo* и *in vitro* позволяют эффективно оценивать специфическую активность современных биотехнологических лекарственных препаратов и могут быть использованы при разработке, создании и испытаниях новых лекарственных средств, относящихся к данной категории.

С каждым годом количество данных препаратов увеличивается, на фармацевтическом рынке появляются новые препараты как для лечения онкологических и аутоиммунных заболеваний, так и для использования в схемах лечения заболеваний другого профиля. Расширяется и спектр аналитических методик для оценки специфической активности новых биотехнологических лекарственных препаратов.

Литература

1. Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
2. Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology. Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series, No. 814. WHO. 2013.
3. Авдеева ЖИ, Волкова РА, Алпатова НА, Борисевич ИВ. Общие принципы разработки программы доклинических испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов генной инженерии. Цитокины и воспаление 2011; 10(4): 5–10.
4. Авдеева ЖИ, Алпатова НА, Солдатов АА, Бондарев ВП, Бунятян НД, Меркулов ВА и др. Особенности доклинических исследований биотехнологических лекарственных препаратов. Иммунология 2015; 36(5): 306–12.
5. Алпатова НА, Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Бондарев ВП, Медуницын НВ. Принципы оценки специфической активности биотехнологических лекарственных препаратов. Цитокины и воспаление 2015; 14(3): 12–6.
6. Яковлев АК, Гайдарова ЛА, Алпатова НА, Лобанова ТН, Постнова ЕЛ, Юрчикова ЕИ и др. Изучение принципов стандартизации фармакологической активности препаратов рекомбинантных эритропоэтинов. Стандартные образцы 2016; (1): 8–20.
7. Мотузова ЕВ, Алпатова НА, Гайдарова ЛА, Рунова ОБ, Волкова РА, Мыца ЕД и др. Разработка и аттестация отраслевого стандартного образца активности филграстима. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16(3): 172–8.
8. Ярилин АА. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.
9. Кетлинский СА, Симбирцев АС. Цитокины. СПб: Фолиант; 2008.
10. Симбирцев АС. Цитокины — новая система регуляции защитных реакций организма. Цитокины и воспаление 2002. 1(1): 9–16.
11. Барinov АН. Тазовые боли с позиции невролога. Available from: <http://inmeda.info/images/restricted/pelvicpain.pdf>.
12. Медуницын НВ, Авдеева ЖИ, Алпатова НА. Препараты на основе цитокинов для иммунотерапии. В кн.: Сб. трудов 5-го Конгресса «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммуофармакологии». Т. 1. Актовые и пленарные лекции. М., 2002. С. 381–97.
13. Авдеева ЖИ. Лекарственные препараты цитокинов. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2005; (1): 17–21.
14. Попов ВФ, Попов ОВ. Лекарственные формы интерферонов: Справ. Врача. М.: Триада-Х, 2002.
15. Ржевский АВ. Золотой век вирусов. Популярная механика 2015; (9): 410–44.
16. Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Алпатова НА, Киселевский МВ, Лысикова СЛ, Бондарев ВП и др. Биоаналоговые (биоподобные) лекарственные препараты рекомбинантного эритропоэтина: оценка качества. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2015; (1): 4–14.
17. Elliott S, Pham E, Macdougall IC. Erythropoietins: a common mechanism of action. Exp Hematol. 2008; 36(12): 1573–84.
18. Меркулов ВА, Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Алпатова НА, Гайдарова ЛА, Яковлев АК, Медуницын НВ. Препараты рекомбинантных эритропоэтинов и их характеристика. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2013; (3): 4–11.
19. Шестакова МВ, Мартынов СА. Анемия при диабетической нефропатии: прогностическое значение, диагностика и лечение. Consilium medicum 2006; (9): 39–43.
20. Ковальчук ЛВ, Ганковская ЛВ, Мешкова РЯ. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2012.
21. Лягоскин ИВ, Берестовой МА, Потеряев ДА, Зейналова ЭС, Вишневский АО, Казаров АА. Валидация ХТТ-теста для оценки антипролиферативной активности препаратов на основе моноклональных антител. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2015; (1): 45–50.
22. Guideline on development, production, characterization and specifications for monoclonal antibodies and related products. London, EMA. 2008.
23. Авдеева ЖИ, Алпатова НА, Волкова РА, Лаптева ЛК. Лекарственные препараты на основе генно-инженерных моноклональных антител. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2011; (2): 14–9.
24. Иванов АА, Белецкий ИП. Терапия моноклональными антителами — панацея или паллиатив? Ремедиум 2011; (3): 12–6.

25. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая. М.: Гриф и К, 2013.
26. Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Алпатова НА, Медуницын НВ, Бондарев ВП, Миронов АН и др. Лекарственные препараты моноклональных антител нового поколения (проблемы и перспективы). Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2015; (1): 21–35.
27. Хаитов РМ, Ярилин АА, Пинегин БВ. Иммунология. Атлас. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. С. 302; 333.
28. Сигидин ЯА, Лукина ГВ. Биологическая терапия в ревматологии. М.: Практическая медицина; 2009.
29. Елисеев МС, Барскова ВГ, Насонов ЕЛ. Роль фактора некроза опухоли- α (ФНО α) в развитии обменных нарушений и атеросклероза и влияние на них ингибиторов ФНО α у больных ревматическими заболеваниями. Научно-практическая ревматология 2009; (2): 67–73.
30. Коваленко ВН, Головач ИЮ, Борткевич ОП. Современные мишени для целевой терапии ревматоидного артрита: от моноклональных антител до блокаторов сигнальных молекул. Украинский ревматологический журнал 2012; 49(3): 5–14.
31. Tarhini AA, Iqbal F. CTLA-4 blockade: therapeutic potential in cancer treatments. *Onco Targets Ther.* 2010; 3: 15–25.
32. Демидов ЛВ, Харкевич ГЮ, Михайлова ИН, Петенко ИН, Самойленко ИВ, Утяшев ИА. Новые направления в лечении больных меланомой кожи. Вестник московского онкологического общества. Информационный бюллетень 2011; 9(580): 4–6.
33. Моисеенко ВМ. Возможности моноклональных антител в лечении злокачественных опухолей. Практическая онкология 2002; 3(4): 253–61.
34. Проценко ГА. Перспективы применения ритуксимаба в ревматологии. Украинский ревматологический журнал 2009; (1): 44–7.
35. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Eurie RA, Genovese MC, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to an-
ti-tumor necrosis factor therapy: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(9): 2793–806.
36. Насонов ЕЛ. Ритуксимаб в лечении ревматических болезней. Научно-практическая ревматология 2008. Приложение к № 1: 3–10.
37. Насонов ЕЛ, ред. Анти-В-клеточная терапия в ревматологии: фокус на ритуксимаб. Монография. М.: ИМА-ПРЕСС; 2012.
38. Maddocks KJ, Lin TS. Update in the management of chronic lymphocytic leukemia. *J Hematol Oncol.* 2009; 2: 2–29.
39. Taylor RP, Lindorfe MA. Drug Insight: the mechanism of action of Rituximab in autoimmune disease—the immune complex decoy hypothesis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007; 3(2): 86–95.
40. Мирошника ОА, ред. Иммуномодуляторы в России: Справочник. Т. 1. Омск: ГП «Омская областная типография»; 2014.
41. Бесова НС. Продолжительность терапии Герцептином при HER2-позитивном раке молочной железы. Эффективная фармакотерапия. Онкология, гематология и радиология 2012; (1): 14–21.
42. Ганьшина ИП, Жукова ЛГ, Тюрин ИЕ. Пертузумаб — новый взгляд на HER2-положительный метастатический рак молочной железы. Фарматека 2014; (17): 52–9.
43. Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, et al. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *J Clin Oncol.* 2010; 28(7): 1138–44.
44. Jones K, Buzdar AU. Evolving novel anti-HER2 strategies. *Lancet Oncol.* 2009; 10(12): 1179–87.
45. Корман ДБ. Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов. М.: «Практическая медицина», 2014. С. 150.

Об авторах

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

Алпатова Наталья Александровна. Главный эксперт лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Гайдерова Лидия Александровна. Начальник лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Яковлев Алексей Константинович. Ведущий микробиолог лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Мотузова Екатерина Валерьевна. Главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. биол. наук.

Лысикова Светлана Леонидовна. Эксперт 1-й категории лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Солдатов Александр Алексеевич. Главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук.

Авдеева Жанна Ильдаровна. Главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Алпатова Наталья Александровна; naal-cytok@yandex.ru

Assessment of biotechnological products specific activity

N. A. Alpatova, L. A. Gayderova, A. K. Yakovlev, E. V. Motuzova, S. L. Lysikova,
A. A. Soldatov, Zh. I. Avdeeva

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The review looks into various aspects of assessing specific activity of biotechnological products, which is one of their key quality parameters. Approaches to the analysis of this parameter and the choice of test procedures are governed by the nature and characteristics of a medicinal product. Test procedures should be adequate and have sufficient sensitivity and specificity. Specific activity of the products in question can be assessed by biological methods both *in vivo* using laboratory animals, which demonstrate the most adequate response to the tested product, and *in vitro* using sensitive cell lines. As-

assessment of specific biological activity helps to characterize the product's pharmacological action and systematically examine the mechanisms of therapeutic effects in clinical practice. Therefore, specific activity of biotechnological products should be assessed using methods appropriate for the proposed mechanism of action. Many biotechnological products, such as cytokine system products, mAbs, fusion proteins and some others call for individual methods for assessment of their specific activity. Biotechnological products are successfully used in the treatment of autoimmune, infectious, oncological, and allergic diseases.

Key words: biotechnological products; cytokines; monoclonal antibodies; specific biological activity; in vitro and in vivo test methods; cell lines.

For citation: Alpatova NA, Gayderova LA, Yakovlev AK, Motuzova EV, Lysikova SL, Soldatov AA, Avdeeva ZhI. Assessment of biotechnological products specific activity. *BIOpreparations. Prevention, diagnosis, treatment* 2017; 17(1): 13–26.

References

1. Federal Law of 12.04.2010, № 61-FZ «On Circulation of Medicines» (in Russian).
2. Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology. Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series, No. 814. WHO. 2013.
3. Avdeeva ZhI, Volkova RA, Alpatova NA, Borisevich IV. General principles of development of preclinical studies program for immunobiological medicinal preparations produced using genetic engineering methods. *Tsitokiny i vospalenie*. 2011; 10(4): 5–10 (in Russian).
4. Avdeeva ZhI, Alpatova NA, Soldatov AA, Bondarev VP, Bunyatyan ND, Merkulov VA, et al. Aspects of preclinical studies of biotech drugs. *Immunologiya* 2015; 36(5): 306–12 (in Russian).
5. Alpatova NA, Avdeeva ZhI, Soldatov AA, Bondarev VP, Medunitsyn NV. Basis of measurement the specific activity of biotech medicinal preparations. *Tsitokiny i vospalenie* 2015; 14(3): 12–6 (in Russian).
6. Yakovlev AK, Gayderova LA, Alpatova NA, Lobanova TN, Postnova EL, Yurchikova EI, et al. Studying of the standardization principles of pharmacological activity of recombinant erythropoietin preparations. *Standartnye obrazy* 2016; (1): 8–20 (in Russian).
7. Motuzova EV, Alpatova NA, Gayderova LA, Runova OB, Volkova RA, Mytsa ED, et al. Development and certification of an industrial reference standard for determination of filgrastim activity. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(3): 172–8 (in Russian).
8. Yarilin AA. *Immunology*. Moscow: GEOTAR-Media; 2010 (in Russian).
9. Ketlinskij SA, Simbircev AS. *Cytokines*. St. Petersburg: Foliant; 2008 (in Russian).
10. Simbircev AS. Cytokines — a new system of regulation of defense reactions. *Tsitokiny i vospalenie*. 2002; 1(1): 9–16 (in Russian).
11. Barinov AN. Pelvic pain from the position of neurologist. Available from: <http://inmeda.info/images/restricted/pelvicpain.pdf> (in Russian).
12. Medunitsyn NV, Avdeeva ZhI, Alpatova NA. Preparations based on cytokines for immunotherapy. In: *Sb. trudov 5-go Kongressa «Sovremennyye problemy allergologii, immunologii i immunofarmakologii»*. V. 1. Aktove i plenarnyye leksii. Moscow. 2002. P. 381–97 (in Russian).
13. Avdeeva ZhI. Medications of cytokines. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2005; (1): 17–21 (in Russian).
14. Popov VF, Popov OV. Dosage forms of interferon. Ref. Physician. Moscow: Triada-X, 2002 (in Russian).
15. Rzheshhevskiy AV. The golden age of viruses. *Populyarnaya mekhanika* 2015; (9): 410–44 (in Russian).
16. Avdeeva ZhI, Soldatov AA, Alpatova NA, Kiselevskiy MV, Lysikova SL, Bondarev VP, et al. Recombinant granulocyte colony stimulating factor biosimilars. Quality assessment. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2015; (1): 4–14 (in Russian).
17. Elliott S, Pham E, Macdougall IC. Erythropoietins: a common mechanism of action. *Exp Hematol*. 2008; 36(12): 1573–84.
18. Merkulov VA, Soldatov AA, Avdeeva ZhI, Alpatova NA, Gayderova LA, Yakovlev AK, Medunitsyn NV. Recombinant erythropoietin preparations and their characteristics. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2013; (3): 4–11 (in Russian).
19. Shestakova MV, Martynov SA. Anemia in diabetic nephropathy: prognostic value, diagnosis and treatment. *Consilium medicum* 2006; 9: 39–43 (in Russian).
20. Koval'chuk LV, Gankovskaya LV, Meshkova RYa. *Clinical immunology and allergology with the basics of immunology*. Moscow: GEOTAR-Media; 2012 (in Russian).
21. Lyagoskin IV, Berestovoy MA, Poteryaev DA, Zeynalova ES, Vishnevskiy AYU, Kazarov AA. Validation of the XTT-test for assessing the antiproliferative activity of biologics on the basis of monoclonal antibodies. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2015; (1): 45–50 (in Russian).
22. Guideline on development, production, characterization and specifications for monoclonal antibodies and related products. London: EMA. 2008.
23. Avdeeva ZhI, Alpatova NA, Volkova RA, Lapteva LK. Medicinal preparations based on monoclonal antibodies. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2011; (2): 14–9 (in Russian).
24. Ivanov AA, Beletskiy IP. Monoclonal antibody therapy — panacea or palliative? *Remedium* 2011; (3): 12–6 (in Russian).
25. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs (immunobiological medicines). V. II. Moscow: Grief and K; 2013 (in Russian).
26. Avdeeva ZhI, Soldatov AA, Alpatova NA, Medunitsyn NV, Bondarev VP, Mironov AN, et al. Preparations of next generation monoclonal antibodies (issues and prospects). *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2015; (1): 21–35 (in Russian).
27. Khaitov RM, Yarilin AA, Pinegin BV. *Immunology. Atlas*. Moscow: GEOTAR-Media; 2011. P. 302 (in Russian).
28. Sigidin YaA, Lukina GV. *Biological therapy in rheumatology*. Moscow: Practical Meditsine; 2009 (in Russian).
29. Eliseev MS, Barskova VG, Nasonov EL. Tumor necrosis factor α (TNF α) role in the development of metabolic disturbances and atherosclerosis and TNF α antagonists influence on them in patients with rheumatic diseases. *Rheumatology Science Practice* 2009; 2: 67–73 (in Russian).
30. Kovalenko VN, Golovach IYu, Bortkevych OP. Current objectives for target treatment of rheumatoid arthritis: from monoclonal antibodies to blockers of signaling pathways molecules. *Ukrainskiy revmatologicheskii zhurnal* 2012; 49(3): 5–14 (in Russian).
31. Tarhini AA, Iqbal F. CTLA-4 blockade: therapeutic potential in cancer treatments. *Onco Targets Ther*. 2010; 3: 15–25.
32. Demidov LV, Kharkevich GYu, Mikhaylova IN, Petenko IN, Samoylenko IV, Utyashev IA. New trends in the treatment of patients with melanoma. *Vestnik moskovskogo onkologicheskogo obshchestva. Informatsionnyy byulleten* 2011; 9(580): 4–6 (in Russian).
33. Moiseenko VM. Options of monoclonal antibodies in the treatment of malignant tumors. *Practical oncology* 2002; 3(4): 253–61 (in Russian).
34. Protchenko GA. The prospects of rituximab usage in rheumatology. *Ukrainskiy revmatologicheskii zhurnal* 2009; 1(35): 44–7.
35. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Eurie RA, Genovese MC, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum*. 2006; 54(9): 2793–806.
36. Nasonov EL. Rituximab in the treatment of rheumatic diseases. *Naučno-prakticheskaya revmatologiya* 2008. Prilozhenie k № 1: 3–10 (in Russian).

37. Nasonov EL, ed. *Anti-B-cell therapy in rheumatology: a focus on rituximab*. Monograph. Moscow: IMA-PRESS; 2012 (in Russian).
38. Maddocks KJ, Lin TS. Update in the management of chronic lymphocytic leukemia. *J Hematol Oncol*. 2009; 2: 2–29.
39. Taylor RP, Lindorfe MA. Drug insight: the mechanism of action of Rituximab in autoimmune disease—the immune complex decoy hypothesis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007; 3(2): 86–95.
40. Miroshnik OA, ed. *Immunomodulators in Russia: Spravochnik*. Omsk: GP «Omskaya oblastnaya tipografiya»; 2014. V. 1 (in Russian).
41. Besova NS. Duration of therapy by Herceptin at a HER2 positive breast cancer. *Effektivnaya farmakoterapiya. Onkologiya, gematologiya i radiologiya* 2012; 1: 14–21 (in Russian).
42. Gan'shina IP, Zhukova LG, Tyurin IE. Pertuzumab — a new view on HER2-positive metastatic breast cancer. *Farmateka* 2014; (17): 52–9 (in Russian).
43. Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, et al. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *J Clin Oncol*. 2010; 28(7): 1138–44.
44. Jones K, Buzdar AU. Evolving novel anti-HER2 strategies. *Lancet Oncol*. 2009; 10(12): 1179–87.
45. Korman DB. Targets and mechanisms of action of antineoplastic preparations. Moscow: *Prakticheskaya meditsina* 2014. P. 150 (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Alpatova NA. Chief expert of the Laboratory of Immunology of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Gayderova LA. Head of the Laboratory of Immunology of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Yakovlev AK. Leading microbiologist of the Laboratory of Immunology of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.

Motuzova EV. Chief expert of the Division for Expert Evaluation of Allergens, Cytokines and other Immunomodulators of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Candidate of Biological Sciences.

Lysikova SL. 1st professional category expert of the Laboratory of Immunology of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Soldatov AA. Chief expert of the Division for Expert Evaluation of Allergens, Cytokines and other Immunomodulators of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences.

Avdeeva Zhl. Chief expert of the Division for Expert Evaluation of Allergens, Cytokines and other Immunomodulators of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences, professor.