

Дизайн доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов: особенности, ключевые принципы и требования

Е. В. Мельникова, О. В. Меркулова, А. А. Чапленко, В. А. Меркулов

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

Поступила 26.06.2017 г. Принята к публикации 04.08.2017 г.

В соответствии с Федеральным законом «О биомедицинских клеточных продуктах», доклинические исследования (ДКИ) являются неотъемлемой частью разработки биомедицинского клеточного продукта (БМКП). В настоящей статье отражены основные принципы реализации требований, представленных в Правилах доклинических исследований БМКП. Основная цель проведения ДКИ БМКП — оценка эффективности, безопасности и биораспределения клеточного продукта. Для достоверной идентификации фармакодинамического действия БМКП в организме хозяина должны применяться должным образом обоснованные маркеры биологической активности. Оценка безопасности БМКП должна быть комплексной для осуществления идентификации, характеристики и количественного анализа потенциальной локальной и системной токсичности, оценки начала ее возникновения, возможности снижения токсичности, а также влияния определенной дозы препарата на результаты исследований токсичности. Конечной целью доклинических токсикологических исследований является получение данных, достаточных для определения возможности и риска проведения клинических исследований БМКП. Ключевыми принципами дизайна ДКИ БМКП являются рациональный подход и обоснование всех принятых в ходе проведения исследования решений. Результаты ДКИ, проведенных в соответствии с требованиями нормативно-правовых актов, могут быть включены в состав досье на БМКП и рассмотрены в процессе регистрации экспертным учреждением Минздрава.

Ключевые слова: доклинические исследования; биомедицинские клеточные продукты; релевантные модели; модели заболеваний; эффективность; оптимальная доза; биораспределение; токсикологические исследования.

Библиографическое описание: Мельникова ЕВ, Меркулова ОВ, Чапленко АА, Меркулов ВА. Дизайн доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов: особенности, ключевые принципы и требования. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(3): 133–144.

К настоящему времени в России имеется некоторый опыт применения препаратов на основе жизнеспособных клеток человека в рамках оказания высокотехнологичной медицинской помощи, для получения разрешения на которую обязательными документами являлись лишь документ, содержащий описание медицинской технологии, и отзывы о возможности использования в медицинской практике заявленной технологии; протоколы доклинических исследований (ДКИ), клинических исследований (КИ), патенты, инструкция по применению могли не предоставляться или предоставлялись при наличии [1]. Вступивший в силу с 1 января 2017 г. Федеральный закон «О биомедицинских клеточных продуктах» (ФЗ-180 от 23.06.2017 г.) регулирует сферу разработки, производства, государственной регистрации и применения продуктов, включающих в себя клеточные линии человека.

В соответствии с Федеральным законом «О биомедицинских клеточных продуктах», доклинические исследования (ДКИ) являются неотъемлемой частью разработки биомедицинского клеточного продукта (БМКП). Отчет о результатах ДКИ, содержащий описание, результаты и их статистический анализ, является одним из необходимых документов, из которых формируется регистрационное досье на БМКП для его государственной регистрации. Ключевые правила проведения ДКИ отражены в Федеральном законе и проекте Правил надлежащей практики по работе с БМКП (далее проект Правил) [2], однако подходы к реализации изложенных в нормативно-правовых документах требований в настоящее время не описаны. В

соответствии с частью 2 проекта Правил, обозначены общие требования к ДКИ БМКП. Необходимый объем доклинических исследований БМКП:

1. Фармакологические исследования.
2. Вторичная фармакология.
3. Кинетические исследования.
4. Токсикологические исследования:
 - общая токсичность (при однократном и многократном введении в определенных проектом Правил случаях);
 - местная токсичность;
 - туморогенность;
 - онкогенность, репродуктивная токсичность, иммуногенность (исследования проводятся в определенных проектом Правил случаях). Все расхождения в качестве между БМКП, использовавшимися в ДКИ, и БМКП, предназначенными для клинических исследований, должны быть объяснены с точки зрения влияния на возможность применения результатов доклинических исследований в клинических исследованиях.

ДКИ являются важным элементом разработки средств медицинского применения, в том числе клеточных продуктов. Основные требования к доклиническому изучению лекарственных препаратов на основе клеток и тканей человека в странах Евросоюза объединены в регулирующем Руководстве ЕМА [3], в США — в Руководстве для отрасли «Доклиническая оценка экспериментальных препаратов для клеточной и генной терапии» [4]. Кроме того, Европейское агентство по лекарственным средствам (ЕМА) по мере накопления данных о разработке и приме-

нении отдельных групп препаратов, подобных БМКП, издаются пояснительные записки, содержащие требования к качеству, ДКИ и КИ. На сегодняшний день существуют отдельные документы («reflection paper»), например:

- по препаратам, содержащим культивированные *in vitro* хондроциты и предназначенным для восстановления коленного хряща (EMA/CAT/CPWP/568181/2009);
- по клиническим аспектам, связанным с препаратами тканевой инженерии (EMA/CAT/CPWP/573420/2009);
- по медицинским продуктам на основе стволовых клеток (EMA/CAT/571134/2009);
- по испытанию активности клеточных иммунотерапевтических медицинских продуктов, предназначенных для лечения рака (EMA/CHMP/BWP/271475/2006 rev. 1 (2016)).

В отличие от доклинических исследований лекарственных средств, принципы проведения которых описаны в Правилах надлежащей лабораторной практики и Руководстве по проведению ДКИ лекарственных средств и МИБП [5], для БМКП разработан проект Правил надлежащей практики по работе с БМКП [4], планируется к разработке Руководство по проведению ДКИ БМКП.

В ДКИ БМКП, также как в ДКИ лекарственных средств [6], выделяют несколько этапов, по мере перехода от фундаментальных разработок к прикладным решениям. На первом этапе («proof-of-concept») производят проверку гипотезы, сформулированной на основании имеющихся научных данных с целью принятия решения о переходе к дальнейшей разработке препарата. Проводят приблизительную оценку эффективности и безопасности продукта, определяют модель и схему исследований для дальнейших этапов, принимают решение о том, какие из исследований будут проводиться согласно требованиям Надлежащей лабораторной практики (GLP), а какие в GLP-подобных условиях. Значительная часть доклинических исследований (токсикологические исследования и оценка биораспределения) должна проводиться исключительно в условиях GLP.

При планировании ДКИ БМКП необходимо решить ряд важных задач — выбрать релевантную(ые) модель(и), разработать перечень исследуемых характеристик безопасности и эффективности и способы их оценки, обосновать дизайн исследования для получения объективных результатов и адекватного их переноса на клиническую модель исследования.

Выбор релевантной модели животного

Выбор животного-модели является одной из критических точек дизайна доклинических исследований. Животное-модель должно подходить для демонстрации эффективности и безопасности терапии БМКП. При проведении ДКИ следует отдавать предпочтение животным, анатомические и физиологические особенности которых близки к таковым у человека настолько, насколько это возможно. В ДКИ БМКП желательно использовать, в том числе, крупных животных (т.е. не грызунов, например, овец или свиней). Однако технические и этические требования к использованию моделей крупных животных часто ограничивают их использование. Существенным недостатком крупных животных по сравнению с грызунами (мышами и крысами) является также отсутствие генетически модифицированных иммунодефицитных линий.

В качестве лабораторных моделей из грызунов наиболее часто используются мыши; иные модели (так называемые «большие» модели, NRM/LAM) включают различ-

ные гетерогенные группы животных: приматов, собак, свиней, овец, кроликов, ламантинов и др. Собаки и приматы широко используются при моделировании болезней органов кровотока, тогда как свиньи — сердечно-сосудистых заболеваний и нарушений обмена веществ. Несмотря на то, что в количественном отношении NRM-модели в научных целях используются реже, в ряде случаев их использование является незаменимым. Например, именно они используются при изучении ВИЧ-инфекции или заболеваний нервной и сердечно-сосудистой систем. Вопрос о преодолении иммунологического барьера должен решаться для каждой отдельной модели изучения выбранного типа клеточной терапии.

Одной из лучших биологических моделей для имитации физиологии организма человека и его заболеваний являются свиньи (*Sus scrofa domestica*), особенно карликовые, которые все чаще используются в ДКИ. В настоящее время в ряде стран продолжают множественные ДКИ препаратов на основе мезенхимальных стромальных клеток (МСК) с использованием свиней: разработка моделей тяжелого комплексного иммунодефицита, кожно-воспалительных заболеваний, муковисцидоза; также доступны индуцированные плюрипотентные клетки свиньи.

В некоторых руководствах, принятых в США и странах Евросоюза, уже рекомендованы определенные биологические модели. Так, в «Пояснительной записке по препаратам, содержащим культивированные *in vitro* хондроциты и предназначенным для восстановления коленного хряща» [7], представлены следующие рекомендации по использованию животных-моделей при ДКИ:

1. Первые *in vivo* исследования по проверке принципа действия могут проводиться на небольших животных-моделях (мыши, крысы, кролики), которые, как правило, позволяют получить данные с большим объемом выборки. Примером может служить модель для исследования эктопического формирования хряща, при которой суспензия человеческих хондроцитов вводится посредством эктопической имплантации иммунокомпрометированному животному. Однако у таких моделей есть свои ограничения, например, другая анатомическая структура коленного сустава, а также сложности с манипуляциями и имитацией клинического использования.

2. Итоговое ДКИ должно проводиться на ортотопической большом животном-модели, чтобы как можно точнее имитировать процесс заживления, характерный для человека, а также позволять проведение инвазивного тестирования. Проведение данного исследования может включать валидацию методик МРТ в качестве структурных конечных точек. Поскольку больших иммунокомпрометированных животных-моделей нет, рекомендуется использовать аутологичные клетки животного происхождения (стратегия «гомологичный препарат»). В настоящее время лучшими из имеющихся больших животных-моделей являются козы, лошади и овцы. Тем не менее, могут использоваться и другие подходящие животные-модели, в том числе карликовые свиньи или коровы.

Учитывая биологические особенности состава БМКП (наличие жизнеспособных клеток человека), использование стандартных животных-моделей затруднено из-за возможности развития иммунного ответа на введенный препарат, поэтому актуальным является использование иммунодефицитных/гуманизированных животных или применение стратегии «гомологичный препарат». Кроме того, для определения механизма действия препарата и

оценки активности конечного продукта могут быть применены *in vitro* модели.

Применение стратегии «гомологичный препарат»

В случаях проведения ДКИ, когда использование БМКП, предназначенного для применения у человека, невозможно или нецелесообразно, допускается применение стратегии «гомологичный препарат». Гомологичный БМКП представляет собой биомедицинский клеточный продукт животного происхождения, сходный с БМКП, предназначенным для использования у человека, по фенотипу клеточной линии, составу, фармакологическим и токсикологическим свойствам, процессу производства и предназначенный для доклинических исследований в случаях, когда использование БМКП, предназначенного для применения у человека, недостаточно, невозможно или нецелесообразно. Гомологичные модели БМКП должны быть получены при помощи сходной технологии с БМКП, предназначенными для применения у человека. Возможные различия в технологии получения могут быть обусловлены использованием животных в качестве донора и (или) реципиента. Гомологичный БМКП должен воспроизводить у животного те же эффекты, которые предполагаются при использовании БМКП, предназначенного для применения у человека. Сходство эффектов является ключевым свойством гомологичной модели БМКП. При использовании данной стратегии доклинического тестирования необходимо учитывать следующие аспекты:

1. Исследуемые гомологичные клеточные продукты должны быть произведены по стандартам, как можно более близким к GMP.

2. Разработчиком должны быть представлены доказательства эквивалентности качества БМКП, используемого в доклинических исследованиях и БМКП, предполагающегося к использованию у человека, например, в отношении процедур сбора ткани, процедур идентификации и получения клеточной линии, условий и процедур технологического процессинга, показателей качества, условий хранения готового продукта и его использования.

3. Фармакологическое действие гомологичных БМКП в организме животного должно быть направлено на ту же терапевтическую мишень, что и действие оригинального препарата в организме человека.

Гомологичный БМКП и технология его производства в большинстве случаев не будут в точности соответствовать технологии производства и параметрам качества БМКП, предназначенного для применения у человека. Все имеющиеся различия между БМКП, предназначенным для применения у человека, и гомологичной моделью БМКП должны быть обоснованы с точки зрения возможности экстраполяции полученных данных с животных на человека.

Модели иммунодефицитных животных

В некоторых случаях структура и функции гомологичных животных клеток и человеческих клеток в БМКП могут отличаться, поэтому непосредственное изучение БМКП на основе клеток человека может обеспечить получение более значимых результатов [8, 9]. Иммунодефицитные модели позволяют напрямую применять препараты человеческих клеток на животных-моделях. Некоторые исследования безопасности (иммуногенность, органотоксичность, общая токсичность) и эффективности

следует проводить с использованием гомологичных животных-моделей, а в исследованиях туморогенности, биораспределения и острой токсичности целесообразно использование подходящих иммунодефицитных животных-моделей.

Наиболее часто в исследованиях БМКП *in vivo* в качестве реципиентов используются линии мышей с иммунодефицитом, что позволяет предупредить отторжение трансплантатов. В настоящее время существует большое количество линий мышей с различным уровнем иммунодефицита. Линии иммунокомпрометированных мышей являются надежными, хорошо отработанными моделями, которые позволяют проводить исследования на выборках значительного размера. Данные линии мышей возникают в результате спонтанных мутаций, либо получаются путем генно-инженерных манипуляций с целью устранения иммунных функций. Одной из наиболее широко используемых линий являются так называемые бестимусные «голые» мыши с мутацией по гену *nude*, обладающие дисфункцией Т-клеточного звена иммунитета. Как следствие, функциональность В-лимфоцитов у таких животных существенно снижена. Существует линия мышей SCID с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (ТКИД) как по Т-, так и по В-клеточному звену, а также ее модификация — диабетические ТКИД-мыши без симптомов ожирения (NOD/SCID) с дисфункцией NK-клеток [10].

Одним из последних достижений в этой области является создание так называемых «гуманизированных» мышей, например, линии NOG/Shi — SCID IL2 γ , у которых нокаутирован ген IL2 γ . Это обеспечивает возможность приживления гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) с последующим развитием частичной функциональности иммунной системы человека [11]. При использовании данной линии мышей можно проводить тестирование БМКП в присутствии элементов иммунной системы человека, а также проводить оценку функциональных возможностей препаратов на основе ГСК. По причине сложности воспроизведения данные модели в настоящее время имеют ограниченное применение в ДКИ и, как правило, не соответствуют требованиям надлежащей лабораторной практики, что снижает ценность их использования в токсикологических исследованиях.

Несмотря на предпринятые в последние годы меры по усовершенствованию моделей с использованием иммунодефицитных мышей, сохраняется мнение о наличии у них недостатков и об ограниченности области их применения. При оценке токсичности полное отсутствие иммунной системы может потенциально приводить к переоценке профиля иммунотоксического действия препарата. Наличие клеток иммунной системы человека в ходе ДКИ может быть необходимым для более полной оценки функциональности БМКП.

Модели *in vitro*

Использование *in vitro* моделей в качестве альтернативы животным чрезвычайно привлекательно с этической и экономической точек зрения [12]. Перечень видов ДКИ, проведение которых возможно без использования животных, постоянно расширяется, однако полная программа ДКИ БМКП не может быть проведена исключительно *in vitro* [13].

Таким образом, *in vitro* исследования не могут полностью заменить исследования на животных, но представляют собой полезное и важное дополнение. В доклиниче-

ских исследованиях БМКП они могут, в частности, помочь выявить механизм действия препарата. Также *in vitro* модели могут применяться для контроля качества в процессе производства, для оценки активности конечного продукта. Например, для оценки эффективности аутологичных дендритно-клеточных вакцин был разработан специальный *in vitro* метод (анализ ко-стимуляции), который в настоящее время широко используется различными производителями [14–17].

Оценка безопасности БМКП также может быть осуществлена с использованием *in vitro* моделей. В то время как биораспределение и туморогенность БМКП должны быть исследованы исключительно *in vivo* [18], иммуногенность и иммунотоксичность аллогенных БМКП возможно исследовать на клеточных моделях. Существуют хорошо отлаженные тест-системы, основанные на сокультивировании БМКП с различными типами аллогенных иммунных клеток.

Модели заболевания/повреждения на животных

Для определения соотношения риска и пользы, связанных с применением БМКП, ДКИ рекомендуется проводить на животных-моделях заболевания/повреждения. Доклинические исследования, проводимые на моделях заболевания/повреждения с использованием животных, помогают понять взаимосвязь между дозой и активностью, а также токсичностью. Кроме того, использование животных-моделей заболевания/повреждения дает потенциальную возможность определения биомаркеров активности-риска, которые могут применяться для мониторинга КИ.

Анализ мирового рынка клеточных технологий показал, что наиболее разработанными направлениями применения (разработки) препаратов на основе клеток и тканей человека в клинической практике в настоящее время являются:

1. Трансплантация аутологичных хондроцитов (в том числе при использовании матриц и скаффолдов) при посттравматических повреждениях хряща крупных суставов (Carticel®, MACI® («Genzyme corp.», США); ChondroCelect® («Tigenix N. V.», Бельгия); NeoCart™ («Histogenics», США); Chondron™ («SewonCellontech», Корея); BioSeed®-C («Bio Tissue Technologies GmbH», Германия, Швейцария, Италия); NOVOCART™, NOVOCART™3D («Tetec Tissue Engineering Technologies AG», Германия) [19]; одним из последних препаратов, получивших одобрение и рекомендации к широкому использованию (marketing authorization) в мае 2017 г. является Spherex («co.don® AG», Германия) [20]).

2. Трансплантация аллогенных островковых клеток поджелудочной железы при сахарном диабете (Pro-Islet («ViaCyte», США), а также разработки в этой области [21–23]);

3. Трансплантация аутологичных и аллогенных фибробластов (и (или) кератиноцитов) для лечения термических ран, трофических язв и косметических дефектов кожи (Apligraf® («Organogenesis», США), Dermagraft® («Advanced Biohealin», США), Epicel® («Genzyme Biosurgery», Cambridge, США), OrCel® («Forticell Bioscience, Inc.», США), HYALOMATRIX®, HYALOGRAFT3D® («Fidia Advanced Biopolymers», Италия), MySkin™ («Altrika», Великобритания) [24, 25]);

4. Дендритно-клеточные вакцины для лечения рака (для лечения рака предстательной железы — Provenge (sipuleucel-T) (США);

5. Использование МСК КМ, ЖТ (Prochymal («Osiris», Канада, Новая Зеландия)).

Далее представлены некоторые примеры животных-моделей заболевания/повреждения, которые могут быть использованы при ДКИ перечисленных видов БМКП.

Модель повреждений суставов для исследований БМКП для регенерации суставного хряща

Независимо от этиологии заболевания, поражение хрящевой ткани суставов является основным фактором в патогенезе остеоартроза. Наиболее часто для моделирования остеоартроза у мелких лабораторных животных используют коленные суставы [26, 27].

По методам формирования остеоартроза можно выделить нехирургические (неинвазивные) и хирургические способы моделирования. Однако при нехирургическом методе для развития серьезных патологических изменений хрящевой ткани требуется длительное время.

Модели остеоартроза, предполагающие хирургическое вмешательство, наиболее многочисленны и используются чаще всего. Как правило, на сустав оказывают прямое воздействие: введением химических веществ, применением физических факторов, нанесением механической травмы. К недостаткам этих моделей следует отнести их достаточно высокую травматичность, трудоемкость, риск инфицирования сустава. Кроме того, операционная травма, наносимая при вмешательстве, также влияет на функциональную способность конечности после операции, поэтому клиническая картина на фоне лечения у таких экспериментальных животных может быть необъективной.

По способу достижения деструктивно-дистрофических нарушений экспериментальные модели в суставах можно разделить на три группы:

- химически индуцированные дегенеративные изменения (введение в сустав стероидных препаратов, гидрокортизона ацетата, дексаметазона, папаина, химопапаина, коллагеназы, витамина А, гипертонического раствора) [28–30]. Недостаток данного способа — сильное системное действие препаратов на весь организм;

- индуцирование дегенеративных изменений физическими факторами (воздействие на суставной хрящ паражидкостной струи азота);

- механически и травматически индуцированные дегенеративные изменения (внутрисуставное введение талька, пересечение ПКС, менискэктомия, миозэктомия, посттравматические состояния, нанесение дефектов хряща и субхондральной кости).

Предложено большое количество хирургических способов моделирования остеоартроза [31–34], например, формирование экспериментального артрита коленного сустава путем удаления латерального мыщелка бедра у кроликов; пересечение передней крестообразной связки (обычно у кроликов и крыс), в том числе в сочетании с повреждением других элементов сустава (удаление медиального мениска и др.). Кроме того, остеоартроз может быть вызван без прямого воздействия на сустав, например при проведении двусторонней овариумэктомии у морских свинок [35].

Отдельное место занимают модели спонтанного остеоартроза, разработанные для различных животных (морских свинок, сирийских хомячков, мышей) [36–38].

При выборе способа моделирования необходимо учитывать, какой тип остеоартроза нужно получить: посттравматический или остеоартроз, имеющий эндогенное (метаболическое) нарушение. Если необходимо в кратчайшие сроки получить выраженный деструктивный процесс, то предпочтение следует отдать методам, предполагающим деструкцию суставной поверхности с повреждением субхондральной костной пластинки. Для изучения процессов репарации только хрящевой ткани дефект должен локализоваться в пределах хряща [39, 40].

Необходимо отметить, что экспериментальная модель адьювантного артрита является моделью [41], позволяющей оценить противовоспалительную активность лекарственных препаратов разных групп в отношении таких патологий, как ревматоидный артрит, артроз и других хронических воспалительных патологий опорно-двигательной системы.

Модель хронической печеночной недостаточности для исследований БМКП для регенерации печени

В настоящее время в литературе описаны следующие способы создания модели хронического гепатита и цирроза печени у млекопитающих:

- помещение животного в клетку с открытым резервуаром, наполненным 70%-ным раствором формалина, где его содержат в течение 5–7 месяцев [42];
- введение химических веществ в желудок лабораторному животному [43–45].
- моделирование алкогольного поражения печени, повреждение печени токсической дозой парацетамола [46];
- введение D(+)-галактозамина [47, 48];
- повреждение печени и моделирование хронической печеночной недостаточности путем пролонгированной заправки четыреххлористым углеродом (CCl_4), который является органоспецифическим токсином, обладающим гепатотропным эффектом [49].

Модель сахарного диабета 1 типа для исследований БМКП для регенерации поджелудочной железы

В настоящее время существует несколько основных способов моделирования экспериментального инсулинзависимого сахарного диабета [50–52]:

- панкреатический сахарный диабет — удаление у собак 9/10 поджелудочной железы;
- аллоксановый сахарный диабет — однократное введение животным аллоксана (вещества, избирательно повреждающего бета-клетки островков поджелудочной железы);
- стрептозотоциновый сахарный диабет — введение животным стрептозотина, избирательно повреждающего бета-клетки островков;
- дитизоновый сахарный диабет — введение животным дитизона, связывающего цинк и таким образом нарушающего депонирование и секрецию инсулина;
- иммунный сахарный диабет — введение животным антител против инсулина;
- метагипофизарный сахарный диабет — длительное введение животным гормонов аденогипофиза (соматотропного гормона, АКТГ);
- метастероидный сахарный диабет — длительное введение животным глюкокортикоидов;

- генетические модели сахарного диабета — выведение чистых линий мышей и других животных с наследственно обусловленной формой болезни [53, 54].

Модель ишемии задней конечности для оценки ангиогенного и регенеративного потенциала БМКП

Оценка ангиогенных свойств БМКП может быть проведена с использованием моделей патологий у животных, например, модели инфаркта миокарда, модели ишемии задних конечностей, модели инсульта и др. [55–58]. Наиболее часто для такой оценки используются грызуны, немаловажную роль при этом играет сходство анатомических и функциональных параметров миокарда у грызунов и человека [55].

Одним из наиболее точных и показательных подходов к моделированию инфаркта миокарда является наложение лигатуры на левую коронарную артерию у крыс [55, 56]. Кроме того, в настоящее время для изучения влияния биологически активных молекул или клеточных препаратов на рост сосудов используется методика подкожного введения Матригеля [59, 60]. Для оценки ангиогенеза в подкожно имплантированном Матригеле необходимо создать условия, при которых введенный материал не будет подвергаться лизису, а введенные клетки сохранят жизнеспособность на протяжении времени, достаточного для оценки ангиогенного ответа.

Модель повреждений кожи для оценки потенциала БМКП для восстановления кожного покрова

Для изучения заболеваний кожи используются различные виды животных, от грызунов до приматов. Наиболее близка к коже человека по эпителиальной архитектуре, плотности нервов и кровеносных сосудов, компонентам матрикса и другим биологическим параметрам кожа свиньи [61, 62]. Однако использование в качестве модели свиньи ввиду экономических соображений размещения и содержания не является оптимальным.

На сегодняшний день наиболее широко используемым животным-моделью для биологических исследований повреждений кожи остаются лабораторные мыши. Однако при планировании экспериментов для оценки потенциала БМКП для восстановления кожного покрова следует учитывать различия в анатомии и физиологии слоев кожи мыши и человека [63], а также гендерное различие в анатомии кожи мыши: кожа самцов на 40 % прочнее за счет гораздо более толстой дермы, в отличие от кожи самок, у которой толще эпидермис и подкожная жировая клетчатка [64].

В литературе описаны различные модели ран, в том числе: резаная; полнослойная; ишемия — реперфузионное повреждение ишемизированной ткани (модель пролежневых язв, хронических ран), ишемизирование лоскута ткани [65, 66].

Выбор типа нанесения раны зависит от предполагаемого ожидаемого терапевтического эффекта БМКП. Полнослойные раны для исследования терапевтического эффекта субстратов используются наиболее часто и подходят для подробного анализа этапов заживления раны [67]. Второй наиболее часто используемой моделью является резаная рана. Вследствие ограниченного объема/площади ранозаживления этот тип раны практически не подходит

дит для оценки эпителизации и биохимии регенерирующих тканей [67].

Характеристики эффективности и подбор оптимальной дозы БМКП

Задачами доклинических исследований являются подтверждение принципа действия, определение фармакологических эффектов, предиктивных в отношении реакции организма человека. Целями подобных исследований являются: получение информации для выбора безопасных доз для использования в клинических исследованиях, получение информации для обоснования способа и графика введения препарата, длительности периода его применения и длительности посттерапевтического периода, во время которого осуществляется сбор информации о побочных реакциях, определение органов-мишеней в отношении токсического воздействия и определение параметров мониторинга пациентов, получающих данную терапию.

Для достоверной идентификации фармакодинамического действия БМКП в организме хозяина должны применяться должным образом обоснованные маркеры биологической активности. Если предполагаемым действием БМКП является, например, восстановление функции дефектных клеток/ткани (восстановление ткани), следует проводить функциональные испытания, чтобы продемонстрировать восстановление функции. Если предполагаемым действием является, например, адоптивная иммунотерапия онкологических больных, биологическое действие должно подкрепляться данными, описывающими иммунологический эффект БМКП.

Целью регенеративной медицины является функциональное восстановление поврежденных тканей с помощью клеточных популяций, вводимых в организм отдельно или совместно с биокаркасами [68, 69]. Учитывая наличие собственного резервного потенциала органа, полная регенерация не является необходимой для полного восстановления функции органа или устранения симптомов заболевания. С другой стороны, существует серьезная проблема клеточной гибели после трансплантации клеток в организм, что необходимо учитывать при расчете терапевтической дозы.

При введении клеточного продукта внутривенно типичная доза составляет $(1,0\text{--}5,0) \cdot 10^6$ клеток/кг массы тела $((0,7\text{--}3,5) \cdot 10^8$ клеток для человека с массой тела 70 кг) [70–72]. Альтернативный внутривенному способу — способ введения инъекцией непосредственно в ткани. При таком способе введения доза вводимого препарата может быть значительно ниже, например, $\sim 10^5$ клеток/кг — для восстановления роговицы или пигментного эпителия сетчатки [73], $\sim 10^9$ клеток/кг — для восстановления клеток сердца (левый желудочек сердца содержит 20 млн. кардиомицитов на 1 г ткани, или всего 4 блн. клеток. При инфаркте миокарда происходит гибель 25 % (1 блн.) этих клеток сердца [74]). Подобная доза клеток вводится и при клеточной терапии диабета.

Прогнозируемая доза, необходимая для лечения неврологических заболеваний, широко варьируется, в основном в зависимости от цели терапии: замена клеток или доставка терапевтических факторов [75].

В клинических протоколах в среднем используется количество МСК, составляющее $2 \cdot 10^6$ /кг массы пациента (например, при лечении тяжелой степени реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ)) [76].

Для определения оптимальной дозы вводимого БМКП используют различные подходы. Наряду с традиционным определением зависимости «доза–эффект», весьма ограниченно применимой к клеточным продуктам, возможно также обоснование выбранной дозы с точки зрения экономической целесообразности. Для этого определяют то количество БМКП, для которого соотношение «стоимость–эффект» будет наиболее оптимальным, безусловно, учитывая этическую сторону вопроса. Кроме того, при выборе дозы необходимо учитывать физиологические особенности конкретной клеточной линии, способность клеток взаимодействовать друг с другом, изменять скорость и характер дифференцировки в зависимости от количества и вида сокультивируемых клеток [3].

Оценка биораспределения БМКП

Клетки могут мигрировать из желаемой локализации и после систематического введения могут перемещаться в другие органы. Кроме того, соматические клетки могут секретировать дополнительные биологически активные молекулы помимо нужного белка.

Традиционные исследования ADME (всасывание, распределение, метаболизм и выведение), как правило, не являются важными для БМКП для применения у человека. Тем не менее, следует проводить исследования, позволяющие продемонстрировать распределение в ткани, жизнеспособность, направленную миграцию, рост, фенотип и любое изменение фенотипа, вызванное факторами новой окружающей среды.

Клетки могут мигрировать по организму хозяина, создавая клинический риск в отношении нежелательных реакций, связанных с перемещением и возможной дифференцировкой клеток. Подобный сценарий необходимо анализировать на животных при помощи специальных методов, позволяющих провести специфическую идентификацию клеток. При изучении биораспределения (плотность, выживаемость, распределение, дифференцировка и интеграция) БМКП в ходе проведения ДКИ на животных-моделях важное значение имеет способ *in vivo* визуализации миграции доставляемых клеток [77, 78]. Существует две основные стратегии мечения клеток: прямое мечение с помощью наночастиц или химических реагентов и непрямое мечение — генетическое введение репортерных генов [78]. Использование прямого мечения клеток предпочтительнее при изучении кинетики в первые несколько дней после введения БМКП в организм животного; генетическая модификация с помощью введения репортерных генов в геном клеток позволяет наблюдать за имплантированными клетками в течение продолжительного времени.

Возможным преимуществом методов визуализации *in vivo* является то, что в большинстве случаев можно изучать одно животное в течение определенного периода времени, что позволяет снизить вариабельность и сократить число используемых животных. При анализе биораспределения использование маленьких животных позволяет осуществить тщательное исследование по обнаружению клеток, тогда как подобное исследование на более крупных животных представляет больше трудностей с практической точки зрения.

В отношении БМКП, продуцирующих системно-активные биомолекулы, следует изучать распределение, длительность и объем экспрессии данных молекул, а так-

же выживаемость и функциональную стабильность клеток в сайтах-мишенях.

Следует контролировать взаимодействие применяемых клеток или окружающей ткани с неклеточными структурными компонентами и другими биоактивными молекулами, а также интеграцию БМКП в окружающую ткань.

Фармакологическая безопасность должна рассматриваться отдельно в каждом индивидуальном случае, в зависимости от характеристик БМКП. Клетки могут секретировать фармакологически активные субстанции, приводящие к нарушению функций ЦНС, сердца, респираторной системы, почек или желудочно-кишечного тракта. Кроме того, теоретически сами клетки также могут вызывать подобные последствия, например, если речь идет о стволовых клетках или мышечных клетках, трансплантированных в области сердца, пораженные инфарктом.

Оценка безопасности БМКП

Оценка безопасности БМКП должна быть комплексной для осуществления идентификации, характеристики и количественного анализа потенциальной локальной и системной токсичности, оценки начала ее возникновения (острое или отложенное), возможности снижения токсичности, а также влияния определенной дозы препарата на результаты исследований токсичности. Конечной целью доклинических токсикологических исследований является получение данных, достаточных для определения возможности и риска проведения клинических исследований БМКП.

Объем необходимых токсикологических исследований зависит от типа БМКП. Токсичность может развиваться, например, из-за неизвестных клеточных изменений, имевших место в процессе производства, таких как изменение характера процесса выведения и изменение поведения *in vivo* в результате дифференцировки клеток. Другие потенциальные факторы, которые могут вызвать токсичность, включают аллогенное использование препарата, присутствие компонентов, которые используются в производственном процессе или являются частью структурного компонента, или пролиферацию применяемых клеток в нежелательных количествах или в нежелательном месте локализации. Токсикологические исследования БМКП должны отражать следующие моменты:

1. Традиционные токсикологические исследования могут понадобиться, например, для комплексных схем лечения, в которых БМКП комбинируется с другими лекарственными средствами или видами лечения, такими как адъюванты/цитокины или облучение соответственно.

2. Необходимо рассматривать потенциальную иммуногенность БМКП вследствие того, что индукция иммунного ответа против самих клеток и (или) полученных из клеток фармакологически активных субстанций может снижать эффективность БМКП.

3. Вопросы, связанные с аутоиммунитетом, необходимо рассматривать, если клетки используются в иммунотерапевтических целях, например в случае с иммунотерапевтическими препаратами для лечения рака.

4. Генотоксические исследования проводятся только в том случае, если природа продуцируемых БМКП факторов указывает на их возможное взаимодействие с ДНК или другим хромосомным материалом.

5. Необходимость исследования влияния препарата на репродуктивную систему зависит от БМКП и должна рассматриваться в индивидуальном порядке.

6. Продолжительность наблюдений в исследованиях хронической токсичности может быть гораздо больше, чем в стандартных исследованиях токсичности однократной дозы, поскольку предполагается, что клетки действуют в течение длительного времени или вызывают длительный эффект, и это необходимо отразить в дизайне данных исследований. Способ введения и режим дозирования должны отражать планируемое клиническое использование. Исследования токсичности многократных доз необходимы, только если клиническое использование подразумевает многократное введение.

7. Риск индукции онкогенеза, связанного с неопластической трансформацией клеток хозяина и клеток БМКП, должен рассматриваться в строго индивидуальном порядке. Исследования онкогенеза предпочтительнее проводить на клетках, находящихся на лимите стандартного культивирования клеток или даже за пределом данного лимита. Также особое внимание во время исследований онкогенеза следует уделять тканям, в которых во время исследований биораспределения были обнаружены применяемые клетки или продукты их экспрессии.

Для препарата Prochymal на основе МСК при определении опухолевого потенциала проводилось стандартное шестинедельное исследование на мышах [79]. Для препарата Holoclar стандартные анализы на канцерогенность/туморогенность были заменены на оценку трансформационного потенциала и пролиферативной активности. Кроме того, были проведены исследования по выявлению геномной нестабильности [80].

8. При выборе методов и моделей проведения исследований на онкогенность особенно важно, чтобы исследования на животных могли показать выживание клеток *in vivo* в течение длительного времени, достаточного для потенциального образования опухоли.

Таким образом, ключевым принципом дизайна ДКИ БМКП является рациональный подход, позволяющий охарактеризовать эффективность и безопасность БМКП, обосновать требования к последующим клиническим исследованиям. Главной задачей ДКИ БМКП являются исследования безопасности, включаемые в программу исследований вне зависимости от типа и вида БМКП. Доклинические исследования следует проводить в соответствии с требованиями «Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами». Это повысит качество получаемых в ходе исследований результатов и увеличит вероятность признания результатов научным сообществом и регуляторными органами.

Литература

1. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 31 декабря 2004 г. № 346 «Об организации выдачи разрешений на применение медицинских технологий» (утратил силу).
2. Доработанный текст проекта Приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации «Об утверждении правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами» (подготовлен Минздравом России 30.10.2016).
3. Guideline on human cell-based medicinal products (London, 21 May 2008. EMEA/CHMP/410869/2006). Available from: <https://goo.gl/VNL448>.
4. Guidance for Industry: Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products (U. S. Food and Drug Administration, November 2013). Available from: <https://goo.gl/32h9MY>.

5. Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. I, II. М.: Гриф и К, 2013.
6. Бурова ЕД, Ходько СВ, Гушина СВ, Макарова МН, Макаров ВГ. Управление рисками для обеспечения качества доклинических исследований лекарственных средств. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(1): 25–32.
7. Reflection paper on in-vitro cultured chondrocyte containing products for cartilage repair of the knee (London, 08 April 2010. EMA/CAT/CPWP/568181/2009). Available from: <https://goo.gl/32b8wa>.
8. Report from CAT-Interested Parties Focus Groups (CAT-IPs FG) on non-clinical development of ATMPs (18 March 2011. EMA/CAT/134694/2011). Available from: <https://goo.gl/QFDMT9>.
9. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. Nature reviews. Nat Rev Immunol. 2007; 7(2): 118–30.
10. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. Blood 2002; 100(9): 3175–82.
11. Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L, Bronz L, Piffaretti JC, Lanzavecchia A, Manz MG. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. Science 2004; 304(5667): 104–7.
12. Astashkina A, Mann B, Grainger DW. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. Pharmacol Ther. 2012; 134(1): 82–106.
13. Hester RE, Harrison RM, eds. Alternatives to animal testing. Issues in Environmental Science and Technology, Vol. 23. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 2006.
14. Shankar G, Bader R, Lodge PA. The COSTIM bioassay: a novel potency test for dendritic cells. J Immunol Methods 2004; 285(2): 293–9.
15. Shankar G, Fourrier MS, Grevenkamp MA, Lodge PA. Validation of the COSTIM bioassay for dendritic cell potency. J Pharm Biomed Anal. 2004; 36(2): 285–94.
16. Hinz T, Buchholz CJ, van der Stappen T, Cichutek K, Kalinke U. Manufacturing and quality control of cell-based tumor vaccines: a scientific and a regulatory perspective. J Immunother. 2006; 29(5): 472–6.
17. Buchholz M, Knauer J, Lehmann J, Hass M, Gargosky S. Qualification of the COSTIM assay to determine potency and use in clinical trials. Cytotherapy 2013; 15(4): S51.
18. Schneider CK, Salmikangas P, Jilma B, Flamion B, Todorova LR, Paphitou A, et al. Challenges with advanced therapy medicinal products and how to meet them. Nat Rev Drug Discov. 2010; 9(3): 195–201.
19. Басок ЮБ, Севастьянов ВИ. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины в лечении дефектов хрящевой ткани суставов. Вестник трансплантологии и искусственных органов 2016; 18(4): 102–22.
20. New advanced therapy to repair cartilage defects in the knee (19 May 2017. EMA/CHMP/315817/2017). Available from: <https://goo.gl/zGVBR9>.
21. Amer LD, Mahoney MJ, Bryant SJ. Tissue engineering approaches to cell-based type 1 diabetes therapy. Tissue Eng Part B Rev. 2014; 20(5): 455–67.
22. Daoud JT, Petropavlovskaja MS, Patapas JM, Degrandpre CE, Dirraddo RW, Rosenberg L, Tabrizian M. Long-term in vitro human pancreatic islet culture using three-dimensional microfabricated scaffolds. Biomaterials 2011; 32(6): 1536–42.
23. Скалецкая ГН, Скалецкий НН, Севастьянов ВИ. Перспективы применения тканеинженерных конструкций поджелудочной железы в лечении сахарного диабета 1-го типа. Вестник трансплантологии и искусственных органов 2016; 18(4): 133–45.
24. Зорин В, Зорина А, Черкасов В, Колпин П, Деев Р, Исаев А и др. Применение аутологичных дермальных фибробластов для коррекции возрастных изменений кожи лица. Результаты годичных исследований. Эстетическая медицина 2012; 11(2): 171–82.
25. Алейник ДЯ, Зорин ВЛ, Еремин ИИ, Корсаков ИН, Чарыкова ИН. Использование клеточных технологий для восстановления повреждений кожи при ожоговой травме. Современные проблемы науки и образования 2015; (4). Available from: <https://goo.gl/3aW9Ug>.
26. Ковалев ГА, Введенский БП, Сандомирский БП. Технология моделирования остеоартроза крупных суставов. Biotechnologia Acta 2010; 3(4): 37–43.
27. Макушин ВД, Степанов МА, Ступина ТА. Экспериментальное моделирование остеоартроза коленного сустава у собак. Биомедицина 2012; (3): 108–15.
28. Yoo SA, Park BH, Yoon HJ, Lee JY, Song JH, Kim HA, et al. Calcineurin modulates the catabolic and anabolic activity of chondrocytes and participates in the progression of experimental osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2007; 56(7): 2299–311.
29. Baragi VM, Becher G, Bendele AM, Biesinger R, Bluhm H, Boer J, et al. A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of osteoarthritis: Evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models. Arthritis Rheum. 2009; 60(7): 2008–18.
30. Методы экспериментального моделирования остеоартроза у мелких экспериментальных животных. Available from: <https://goo.gl/n6jd3t>.
31. Ozkan FU, Ozkan K, Ramadan S, Guven Z. Chondroprotective effect of N-acetylglucosamine and hyaluronate in early stages of osteoarthritis — an experimental study in rabbits. Bull NYU Hosp Jt Dis. 2009; 67(4): 352–7.
32. Jean YH, Wen ZH, Chang YC, Hsieh SP, Tang CC, Wang YH, Wong CS. Intraarticular injection of the cyclooxygenase-2 inhibitor parecoxib attenuates osteoarthritis progression in anterior cruciate ligament-transected knee in rats: role of excitatory amino acids. Osteoarthritis Cartilage 2007; 15(6): 638–45.
33. Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, McLane J, Bone A, Destefano J, et al. The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. Arthritis Rheum. 2004; 50(4): 1193–206.
34. Janusz MJ, Bendele AM, Brown KK, Taiwo YO, Hsieh L, Heitmeyer SA. Induction of osteoarthritis in the rat by surgical tear of the meniscus: Inhibition of joint damage by a matrix metalloproteinase inhibitor. Osteoarthritis Cartilage 2002; 10(10): 785–91.
35. Dai G, Wang S, Li J, Liu C, Liu Q. The validity of osteoarthritis model induced by bilateral ovariectomy in guinea pig. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci. 2006; 26(6): 716–9.
36. Bendele AM, Hulman JF. Spontaneous cartilage degeneration in guinea pigs. Arthritis Rheum. 1988; 31(4): 561–5.
37. Bendele AM. Animal models of osteoarthritis in an era of molecular biology. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2002; 2(6): 501–3.
38. Uchida K, Urabe K, Naruse K, Ogawa Z, Mabuchi K, Itoman M. Hyperlipidemia and hyperinsulinemia in the spontaneous osteoarthritis mouse model, STR/Ort. Exp Anim. 2009; 58(2): 181–7.
39. Vallon R, Freuler F, Desta-Tsedu N, Robeva A, Dawson J, Wenner P, et al. Serum amyloid A (apoSAA) expression is up-regulated in rheumatoid arthritis and induces transcription of matrix metalloproteinases. J Immunol. 2001; 166(4): 2801–7.
40. Шиманский ВА, Кушнир ВА, Фролов ВИ, Крашенинников МЕ, Баранова ОВ, Онищенко НА. Применение аутологичных клеток костного мозга для торможения разрушения структуры хряща при остеоартрозе коленных суставов. В кн.: Шумкова ВИ, Онищенко НА, ред. Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органных дисфункций. М.: ЛАВР, 2009. С. 213–24.
41. Hedlund P, Matsumoto K, Andersson KE. Animal models of erectile dysfunction. Curr Protoc Pharmacol. 2005; Chapter 5: Unit 5.41.
42. Полянских ЛС, Петросян МА, Жесткова НВ, Балашова НН. Экспериментальные модели патологии печени. Экспериментальная и клиническая фармакология 2017; 80(2): 39–44.
43. Мышкин ВА, Ибатуллина РБ, Волкова ЕС, Савлуков АИ, Симонова НИ. Способ моделирования токсической гепатопатии. Патент Российской Федерации, № 2188457; 2002.
44. Мышкин ВА, Ибатуллина РБ, Савлуков АИ, Симонова НИ, Бакиров АБ. Способ моделирования цирроза печени. Патент Российской Федерации, № 2197018; 2003.

45. Рыкало НА, Гуминская ОЮ. Закономерности и особенности репаративной регенерации печени неполовозрелых крыс на фоне хронического медикаментозного гепатита в эксперименте. *Журнал анатомии и гистопатологии* 2014; 3(1): 37–9.
46. Хабриев РУ, ред. Руководство по проведению клинических исследований новых лекарственных средств. М., 2005. С. 360.
47. Венгеровский АИ, Коваленко МЮ, Арбузов АГ, Головина ЕЛ, Чучалин ВС, Соснина НВ и др. Влияние гепатопротекторов растительного происхождения на эффекты преднизолона при экспериментальном токсическом гепатите. *Растительные ресурсы* 1998; 34(3): 91–6.
48. Грицай ДВ, Лебединский АС, Оченашко ОВ, Розульская ЕЮ, Петренко ЮА, Лозинский ВИ и др. Трансплантация криоконсервированных клеток фетальной печени, заселенных в макропористые альгинат-желатиновые матрицы, крысам с печеночной недостаточностью. *Вестник трансплантологии и искусственных органов* 2015; 17(3): 50–7.
49. Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Watari A, Kobayashi M, et al. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCL4-induced liver injury. *Biol Pharm Bull.* 2010; 33(6): 983–7.
50. Nir T, Melton DA, Dor Y. Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration. *J Clin Invest.* 2007; 117(9): 2553–61.
51. Cardinal JW, Allan DJ, Cameron DP. Poly(ADP-ribose)polymerase activation determines strain sensitivity to streptozotocin-induced beta cell death in inbred mice. *J Mol Endocrinol.* 1999; 22(1): 65–70.
52. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001; 50(6): 537–46.
53. Toyoda H, Formby B. Contribution of T cells to the development of autoimmune diabetes in the NOD mouse model. *Bioessays* 1998; 20(9): 750–7.
54. Green EA, Flavell RA. Tumor necrosis factor- α and the progression of diabetes in non-obese diabetic mice. *Immunol Rev.* 1999; 169: 11–22.
55. Zornoff LA, Paiva SA, Minicucci MF, Spadaro J. Experimental myocardial infarction in rats: analysis of the model. *Arq Bras Cardiol.* 2009; 93(4): 434–40, 426–32.
56. Chimenti S, Carlo E, Masson S, Bai A, Latini R. Myocardial infarction: animal models. *Methods Mol Med.* 2004; 98: 217–26.
57. Limbourg A, Korff T, Napp LC, Schaper W, Drexler H, Limbourg FP. Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat Protoc.* 2009; 4(12): 1737–46.
58. Lotfi S, Patel AS, Mattock K, Egginton S, Smith A, Modarai B. Towards a more relevant hind limb model of muscle ischaemia. *Atherosclerosis* 2013; 227(1): 1–8.
59. Shevchenko EK, Makarevich PI, Tsokolaeva ZI, Boldyreva MA, Sysoeva VY, Tkachuk VA, Parfyonova YV. Transplantation of modified human adipose derived stromal cells expressing VEGF165 results in more efficient angiogenic response in ischemic skeletal muscle. *J Transl Med.* 2013; 11: 138.
60. Traktuev DO, Prater DN, Merfeld-Clauss S, Sanjeevaiah AR, Saadatadeh MR, Murphy M, et al. Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. *Circ Res.* 2009; 104(12): 1410–20.
61. Xie Y, Zhu KQ, Deubner H, Emerson DA, Carrougner GJ, Gibran NS, Engrav LH. The microvasculature in cutaneous wound healing in the female red Duroc pig is similar to that in human hypertrophic scars and different from that in the female Yorkshire pig. *J Burn Care Res.* 2007; 28(3): 500–6.
62. Zhu KQ, Carrougner GJ, Gibran NS, Isik FF, Engrav LH. Review of the female Duroc/Yorkshire pig model of human fibroproliferative scarring. *Wound Repair Regen.* 2007; 15 Suppl 1: S32–9.
63. Porter RM. Mouse models for human hair loss disorders. *J Anat.* 2003; 202(1): 125–31.
64. Azzi L, El-Alfy M, Martel C, Labrie F. Gender differences in mouse skin morphology and specific effects of sex steroids and dehydroepiandrosterone. *J Invest Dermatol.* 2005; 124(1): 22–7.
65. Chen JS, Longaker MT, Gurtner GC. Murine models of human wound healing. *Methods Mol Biol.* 2013; 1037: 265–74.
66. Lindblad WJ. Considerations for selecting the correct animal model for dermal wound-healing studies. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2008; 19(8): 1087–96.
67. Ansell DM, Campbell L, Thomason HA, Brass A, Hardman MJ. A statistical analysis of murine incisional and excisional acute wound models. *Wound Repair Regen.* 2014; 22(2): 281–7.
68. Naumova AV, Modo M, Moore A, Murry CE, Frank JA. Clinical imaging in regenerative medicine. *Nat Biotechnol.* 2014; 32(8): 804–18.
69. Daar AS, Greenwood HL. A proposed definition of regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007; 1(3): 179–84.
70. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev.* 2009; 18(5): 683–92.
71. Harting MT, Jimenez F, Xue H, Fischer UM, Baumgartner J, Dash PK, Cox CS. Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2009; 110(6): 1189–97.
72. Everaert BR, Bergwerf I, De Vocht N, Ponsaerts P, Van Der Linden A, Timmermans JP, Vrints CJ. Multimodal in vivo imaging reveals limited allograft survival, intrapulmonary cell trapping and minimal evidence for ischemia-directed BMSC homing. *BMC Biotechnol.* 2012; 12: 93.
73. Ramsden CM, Powner MB, Carr AJ, Smart MJ, da Cruz L, Coffey PJ. Stem cells in retinal regeneration: past, present and future. *Development* 2013; 140(12): 2576–85.
74. Husser O, Monmeneu JV, Bonanad C, Gomez C, Chaustre F, Nunez J, et al. Head-to-head comparison of 1 week versus 6 months CMR-derived infarct size for prediction of late events after STEMI. *Int J Cardiovasc Imaging* 2013; 29(7): 1499–509.
75. Kumar R, Nguyen HD, Ogren JA, Macey PM, Thompson PM, Fonarow GC, et al. Global and regional putamen volume loss in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2011; 13(6): 651–5.
76. Шаманская ТВ, Осипова ЕЮ, Пурбуева ББ, Устюгов АЮ, Асирелина ТА, Яковлева МВ, Румянцев СА. Культивирование мезенхимальных стволовых клеток ex vivo в различных питательных средах (обзор литературы и собственный опыт). *Онкогематология* 2010; 3: 65–71.
77. Correa PL, Mesquita CT, Felix RM, Azevedo JC, Barbirato GB, Falcão CH, et al. Assessment of intra-arterial injected autologous bone marrow mononuclear cell distribution by radioactive labeling in acute ischemic stroke. *Clin Nucl Med.* 2007; 32(11): 839–41.
78. Daadi MM, Li Z, Arac A, Grueter BA, Sofilos M, Malenka RC, et al. Molecular and magnetic resonance imaging of human embryonic stem cell-derived neural stem cell grafts in ischemic rat brain. *Mol Ther.* 2009; 17(7): 1282–91.
79. Australian Public Assessment Report for Remestemcel-L, ex vivo adult human mesenchymal stem cells. Prochymal® (Osiris). Available from: <https://goo.gl/YEKuWf>.
80. Assessment report. Holoclar (18 December 2014. EMA/25273/2015). Available from: <https://goo.gl/ns68Yq>.

Об авторах

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

Мельникова Екатерина Валерьевна. Ведущий эксперт лаборатории биомедицинских клеточных продуктов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. биол. наук.

Меркулова Ольга Владимировна. Ведущий эксперт лаборатории биомедицинских клеточных продуктов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. мед. наук.

Чаплинко Александр Андреевич. Эксперт 2 категории лаборатории биомедицинских клеточных продуктов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.

Меркулов Вадим Анатольевич. Заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Чаплинко Александр Андреевич; Chaplenko@expmed.ru

Design of preclinical studies of biomedical cell products: characteristics, key principles and requirements

Е. В. Мельникова, О. В. Меркулова, А. А. Чапленко, В. А. Меркулов

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»

Ministry of Health of Russian Federation, 127051, Moscow, Petrovsky Boulevard 8, bld. 2, Moscow, 127051, Russian Federation

According to the Federal Law «On Biomedical Cell Products», preclinical trials are an integral part of biomedical cell product (BCP) development. This article describes the basic principles of fulfilling requirements laid down in the Rules for conducting preclinical trials of BCPs. The main objective of preclinical trials is evaluation of efficacy, safety and biodistribution of cell products. Properly justified markers of biological activity must be used for reliable identification of BCP pharmacodynamic action in the host organism. BCP safety assessment must be comprehensive and include identification, characterization and quantitative evaluation of potential local and systemic toxicity, estimation of the onset of toxicity and possibility of its reduction, and the effect of a particular drug dose on the results of toxicity studies. The ultimate goal of preclinical toxicity studies is to obtain data sufficient for making a conclusion on the possibility of conducting clinical trials of BCP and determining associated risks. The key principles of preclinical trials design are a rational approach and justification of all decisions made during the study. The results of preclinical trials that were conducted in compliance with the law, can be included in the BCP dossier and considered during the product authorization by the expert institution of the Ministry of Health.

Key words: preclinical studies; biomedical cell products; relevant models; disease models; efficacy; optimal dose; bio-distribution; toxicity studies.

For citation: Melnikova EV, Merkulova OV, Chaplenko AA, Merkulov VA. Design of preclinical studies of biomedical cell products: characteristics, key principles and requirements. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(3): 133–144.

References

1. Order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation of December 31, 2004 № 346 «On the procedure for issuing permits for the application of medical technologies» (repealed) (in Russian).
2. Revised draft of Order of the Ministry of Health of the Russian Federation «On approval of rules of good practice for working with biomedical cell products» (prepared by the Ministry of Health of the Russian Federation on October 30, 2016) (in Russian).
3. Guideline on human cell-based medicinal products (London, 21 May 2008. EMEA/CHMP/410869/2006). Available from: <https://goo.gl/VNLa48>.
4. Guidance for Industry: Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products (U. S. Food and Drug Administration, November 2013). Available from: <https://goo.gl/32h9MY>.
5. Mironov AN, ed. Manual on expertise of medicines. Vol. I, II. M.: Grif and K, 2013 (in Russian).
6. Burova ED, Khodko SV, Gushchina SV, Makarova MN, Makarov VG. Risk management for quality assurance of preclinical research. The Bulletin of the Scientific for Expert Evaluation of Medicinal Products 2017; 7(1): 25–32 (in Russian).
7. Reflection paper on in-vitro cultured chondrocyte containing products for cartilage repair of the knee (London, 08 April 2010. EMA/CAT/CPWP/568181/2009). Available from: <https://goo.gl/32b8wa>.
8. Report from CAT-Interested Parties Focus Groups (CAT-IPs FG) on non-clinical development of ATMPs (18 March 2011. EMA/CAT/134694/2011). Available from: <https://goo.gl/QFDMT9>.
9. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. Nat Rev Immunol. 2007; 7(2): 118–30.
10. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, et al. NOD/SCID(gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. Blood 2002; 100(9): 3175–82.
11. Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L, Bronz L, Piffaretti JC, Lanzavecchia A, Manz MG. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. Science 2004; 304(5667): 104–7.
12. Astashkina A, Mann B, Grainger DW. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. Pharmacol Ther. 2012; 134(1): 82–106.
13. Hester RE, Harrison RM, eds. Alternatives to animal testing. Issues in Environmental Science and Technology, Vol. 23. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 2006.
14. Shankar G, Bader R, Lodge PA. The COSTIM bioassay: a novel potency test for dendritic cells. J Immunol Methods 2004; 285(2): 293–9.
15. Shankar G, Fourrier MS, Grevenkamp MA, Lodge PA. Validation of the COSTIM bioassay for dendritic cell potency. J Pharm Biomed Anal. 2004; 36(2):285–94.
16. Hinz T, Buchholz CJ, van der Stappen T, Cichutek K, Kalinke U. Manufacturing and quality control of cell-based tumor vaccines: a scientific and a regulatory perspective. J Immunother. 2006; 29(5): 472–6.
17. Buchholz M, Knauer J, Lehmann J, Hass M, Gargosky S. Qualification of the COSTIM assay to determine potency and use in clinical trials. Cytotherapy 2013; 15(4): S51.
18. Schneider CK, Salmikangas P, Jilma B, Flamion B, Todorova LR, Paphitou A, et al. Challenges with advanced therapy medicinal products and how to meet them. Nat Rev Drug Discov. 2010; 9(3): 195–201.
19. Basok YuB, Sevastianov VI. Tissue engineering and regenerative medicine technologies in the treatment of articular cartilage defects. Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs 2016; 18(4):102–22 (in Russian).
20. New advanced therapy to repair cartilage defects in the knee (19 May 2017. EMA/CHMP/315817/2017). Available from: <https://goo.gl/zGVBR9>.
21. Amer LD, Mahoney MJ, Bryant SJ. Tissue engineering approaches to cell-based type 1 diabetes therapy. Tissue Eng Part B Rev. 2014; 20(5): 455–67.
22. Daoud JT, Petropavlovskaya MS, Patapas JM, Degrandpre CE, Diraddo RW, Rosenberg L, Tabrizian M. Long-term in vitro human pancreatic islet culture using three-dimensional microfabricated scaffolds. Biomaterials 2011; 32(6): 1536–42.
23. Skaletskaya GN, Skaletskiy NN, Sevastianov VI. Prospects of application of tissue-engineered pancreatic constructs in the treatment of type 1 diabetes. Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs 2016; 18(4): 133–45 (in Russian).
24. Zorin V, Zorina A, Cherkasov V, Kopnin P, Deev P, Isaev A, et al. The use of autologous dermal fibroblasts for the correction of age-related changes in the facial skin. The results of a year's research. Aesthetic medicine 2012; 11(2): 171–82 (in Russian).
25. Aleynik DY, Zorin VL, Eremin II, Korsakov IN, Charykova IN. Use of cell technologies for skin damage recovery in burn injuries. Modern

- problems of science and education 2015; (4). Available from: <https://goo.gl/3aW9Ug> (in Russian).
26. Koval'ov GA, Vvedenskyy BP, Sandomirskiy BP. Technology of modeling of large joints osteoarthritis. *BIOTECHNOLOGIA ACTA* 2010; 3(4): 37–43 (in Russian).
 27. Makushin VD, Stepanov MA, Stupina TA. Experimental modeling of the knee joint osteoarthritis in dogs. *Biomedicine* 2012; (3): 108–15 (in Russian).
 28. Yoo SA, Park BH, Yoon HJ, Lee JY, Song JH, Kim HA, et al. Calcineurin modulates the catabolic and anabolic activity of chondrocytes and participates in the progression of experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(7): 2299–311.
 29. Baragi VM, Becher G, Bendele AM, Biesinger R, Bluhm H, Boer J, et al. A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of osteoarthritis: Evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(7): 2008–18.
 30. Methods of experimental modeling of osteoarthritis in experimental small animals. Available from: <https://goo.gl/n6jd3t> (in Russian).
 31. Ozkan FU, Ozkan K, Ramadan S, Guven Z. Chondroprotective effect of N-acetylglucosamine and hyaluronate in early stages of osteoarthritis — an experimental study in rabbits. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2009; 67(4): 352–7.
 32. Jean YH, Wen ZH, Chang YC, Hsieh SP, Tang CC, Wang YH, Wong CS. Intraarticular injection of the cyclooxygenase-2 inhibitor parecoxib attenuates osteoarthritis progression in anterior cruciate ligament-transected knee in rats: role of excitatory amino acids. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15(6): 638–45.
 33. Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, McLane J, Bone A, Destefano J, et al. The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum.* 2004; 50(4): 1193–206.
 34. Janusz MJ, Bendele AM, Brown KK, Taiwo YO, Hsieh L, Heitmeyer SA. Induction of osteoarthritis in the rat by surgical tear of the meniscus: Inhibition of joint damage by a matrix metalloproteinase inhibitor. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10(10): 785–91.
 35. Dai G, Wang S, Li J, Liu C, Liu Q. The validity of osteoarthritis model induced by bilateral ovariectomy in guinea pig. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2006; 26(6): 716–9.
 36. Bendele AM, Hulman JF. Spontaneous cartilage degeneration in guinea pigs. *Arthritis Rheum.* 1988; 31(4): 561–5.
 37. Bendele AM. Animal models of osteoarthritis in an era of molecular biology. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2002; 2(6): 501–3.
 38. Uchida K, Urabe K, Naruse K, Ogawa Z, Mabuchi K, Itoman M. Hyperlipidemia and hyperinsulinemia in the spontaneous osteoarthritis mouse model, STR/Ort. *Exp Anim.* 2009; 58(2): 181–7.
 39. Vallon R, Freuler F, Desta-Tsedu N, Robeva A, Dawson J, Wenner P, et al. Serum amyloid A (apoSAA) expression is up-regulated in rheumatoid arthritis and induces transcription of matrix metalloproteinases. *J Immunol.* 2001; 166(4): 2801–7.
 40. Shimansky VA, Kushnir VA, Frolov VI, Krashennikov IU, Baranova S, Onishchenko NA. The use of autologous bone marrow cells for inhibition of the destruction of the structure of cartilage in osteoarthritis of the knee. In: Shumakov VI, Onishchenko NA, eds. *Biological reserves bone marrow cells and correction of organ dysfunction.* M.: LAVR, 2009. P. 213–24 (in Russian).
 41. Hedlund P, Matsumoto K, Andersson KE. Animal models of erectile dysfunction. *Curr Protoc Pharmacol.* 2005; Chapter 5: Unit 5.41.
 42. Polyanskikh LS, Petrosyan MA, Zhestkova NV, Balashova NN. Experimental Models of Liver Disorders (Review). *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology* 2017; 80(2): 39–44 (in Russian).
 43. Myshkin VA, Ibatullina RB, Volkova ES, Savlukov AI, Simonova NI. The method of modeling toxic hepatopathy. Patent RF 2188457; 2002 (in Russian).
 44. Myshkin VA, Ibatullina RB, Savlukov AI, Simonova NI, Bakirov AB. The method of modeling liver cirrhosis. Patent RF 2197018; 2003 (in Russian).
 45. Rykalo NA, Guminskaya OYu. The regularities and peculiarities of liver reparative regeneration in immature rats on the background of experimental chronic drug-induced hepatitis. *Journal of Anatomy and Histopathology* 2014; 3(1): 37–9 (in Russian).
 46. Khabriev RU, ed. Guidelines for conducting clinical trials of new drugs. M., 2005. C. 360. (in Russian).
 47. Vengerovsky AI, Kovalenko MJ, Arbuzov AG, Golovina EL, Chuchalin VS, Sosnina NV, et al. Influence of hepatoprotectors of vegetable origin on the effects of prednisolone in experimental toxic hepatitis. *Plant resources* 1998; 34(3): 91–6 (in Russian).
 48. Grizay DV, Lebedinsky AS, Ochenashko OV, Rogul'ska OY, Petrenko YA, Lozinsky VI, et al. Transplantation of cryopreserved fetal liver cells seeded into macroporous alginate-gelatin scaffolds in rats with liver failure. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs* 2015; 17(3): 50–7 (in Russian).
 49. Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Watari A, Kobayashi M, et al. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl₄-induced liver injury. *Biol Pharm Bull.* 2010; 33(6): 983–7.
 50. Nir T, Melton DA, Dor Y. Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration. *J Clin Invest.* 2007; 117(9): 2553–61.
 51. Cardinal JW, Allan DJ, Cameron DP. Poly(ADP-ribose)polymerase activation determines strain sensitivity to streptozotocin-induced beta cell death in inbred mice. *J Mol Endocrinol.* 1999; 22(1): 65–70.
 52. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001; 50(6): 537–46.
 53. Toyoda H, Formby B. Contribution of T cells to the development of autoimmune diabetes in the NOD mouse model. *Bioessays* 1998; 20(9): 750–7.
 54. Green EA, Flavell RA. Tumor necrosis factor- α and the progression of diabetes in non-obese diabetic mice. *Immunol Rev.* 1999; 169: 11–22.
 55. Zornoff LA, Paiva SA, Minicucci MF, Spadaro J. Experimental myocardial infarction in rats: analysis of the model. *Arq Bras Cardiol.* 2009; 93(4): 434–40, 426–32.
 56. Chimenti S, Carlo E, Masson S, Bai A, Latini R. Myocardial infarction: animal models. *Methods Mol Med.* 2004; 98: 217–26.
 57. Limbourg A, Korff T, Napp LC, Schaper W, Drexler H, Limbourg FP. Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat Protoc.* 2009; 4(12): 1737–46.
 58. Lotfi S, Patel AS, Mattock K, Egginton S, Smith A, Modarai B. Towards a more relevant hind limb model of muscle ischaemia. *Atherosclerosis* 2013; 227(1): 1–8.
 59. Shevchenko EK, Makarevich PI, Tsokolaeva ZI, Boldyreva MA, Sysoeva VY, Tkachuk VA, Parfyonova YV. Transplantation of modified human adipose derived stromal cells expressing VEGF165 results in more efficient angiogenic response in ischemic skeletal muscle. *J Transl Med.* 2013; 11: 138.
 60. Traktuev DO, Prater DN, Merfeld-Claus S, Sanjeevaiah AR, Saadat-zadeh MR, Murphy M, et al. Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. *Circ Res.* 2009; 104(12): 1410–20.
 61. Xie Y, Zhu KQ, Deubner H, Emerson DA, Carrougier GJ, Gibran NS, Engrav LH. The microvasculature in cutaneous wound healing in the female red Duroc pig is similar to that in human hypertrophic scars and different from that in the female Yorkshire pig. *J Burn Care Res.* 2007; 28(3): 500–6.
 62. Zhu KQ, Carrougier GJ, Gibran NS, Isik FF, Engrav LH. Review of the female Duroc/Yorkshire pig model of human fibroproliferative scarring. *Wound Repair Regen.* 2007; 15 Suppl 1: S32–9.
 63. Porter RM. Mouse models for human hair loss disorders. *J Anat.* 2003; 202(1): 125–31.
 64. Azzi L, El-Alfy M, Martel C, Labrie F. Gender differences in mouse skin morphology and specific effects of sex steroids and dehydroepiandrosterone. *J Invest Dermatol.* 2005; 124(1): 22–7.
 65. Chen JS, Longaker MT, Gurtner GC. Murine models of human wound healing. *Methods Mol Biol.* 2013; 1037: 265–74.
 66. Lindblad WJ. Considerations for selecting the correct animal model for dermal wound-healing studies. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2008; 19(8): 1087–96.
 67. Ansell DM, Campbell L, Thomason HA, Brass A, Hardman MJ. A statistical analysis of murine incisional and excisional acute wound models. *Wound Repair Regen.* 2014; 22(2): 281–7.
 68. Naumova AV, Modo M, Moore A, Murry CE, Frank JA. Clinical imaging in regenerative medicine. *Nat Biotechnol.* 2014; 32(8): 804–18.
 69. Daar AS, Greenwood HL. A proposed definition of regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007; 1(3): 179–84.
 70. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev.* 2009; 18(5): 683–92.

71. Harting MT, Jimenez F, Xue H, Fischer UM, Baumgartner J, Dash PK, Cox CS. Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2009; 110(6): 1189–97.
72. Everaert BR, Bergwerf I, De Vocht N, Ponsaerts P, Van Der Linden A, Timmermans JP, Vrints CJ. Multimodal in vivo imaging reveals limited allograft survival, intrapulmonary cell trapping and minimal evidence for ischemia-directed BMSC homing. *BMC Biotechnol.* 2012; 12: 93.
73. Ramsden CM, Powner MB, Carr AJ, Smart MJ, da Cruz L, Coffey PJ. Stem cells in retinal regeneration: past, present and future. *Development* 2013; 140(12): 2576–85.
74. Husser O, Monmeneu JV, Bonanad C, Gomez C, Chaustre F, Nunez J, et al. Head-to-head comparison of 1 week versus 6 months CMR-derived infarct size for prediction of late events after STEMI. *Int J Cardiovasc Imaging* 2013; 29(7): 1499–509.
75. Kumar R, Nguyen HD, Ogren JA, Macey PM, Thompson PM, Fonarow GC, et al. Global and regional putamen volume loss in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2011; 13(6): 651–5.
76. Shamanskaya TV, Osipova YeYu, Purbueva BB, Ustyugov AYU, Astrelina TA, Yakovleva MV, Rumyantsev SA. Ex vivo expansion of mesenchymal stem cells in different culture conditions (the literature review and own experience). *Oncohematology* 2010; 3: 65–71 (in Russian).
77. Correa PL, Mesquita CT, Felix RM, Azevedo JC, Barbirato GB, Falcão CH, et al. Assessment of intra-arterial injected autologous bone marrow mononuclear cell distribution by radioactive labeling in acute ischemic stroke. *Clin Nucl Med.* 2007; 32(11): 839–41.
78. Daadi MM, Li Z, Arac A, Grueter BA, Sofilos M, Malenka RC, et al. Molecular and magnetic resonance imaging of human embryonic stem cell-derived neural stem cell grafts in ischemic rat brain. *Mol Ther.* 2009; 17(7): 1282–91.
79. Australian Public Assessment Report for Remestemcel-L, ex vivo adult human mesenchymal stem cells. Prochymal® (Osiris). Available from: <https://goo.gl/YEKuWf>.
80. Assessment report. Holoclar (18 December 2014. EMA/25273/2015). Available from: <https://goo.gl/ns68Yq>.

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.

Melnikova EV. Leading expert of the Laboratory of Biomedical Cell Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Merkulova OV. Leading expert of the Laboratory of Biomedical Cell Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Chaplenko AA. 2nd professional category expert of the Laboratory of Biomedical Cell Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

Merkulov VA. Deputy Director-General for Medicinal Products' Evaluation. Doctor of Medical Sciences, professor.

Contact e-mail: Chaplenko Alexander Andreevich; Chaplenko@expmed.ru