

БИО ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Рецензируемый научно-практический журнал
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Том 17, № **3**
Июль – сентябрь 2017



ISSN 2221-996X



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

Разработка и валидация методики определения концентрации экулизумаба
в плазме крови человека с применением технологии биослойной
интерферометрии

Редакция журнала не несет ответственности за содержание рекламных материалов.

Точка зрения авторов может не совпадать с мнением редакции журнала.

К публикации принимаются только статьи, подготовленные в соответствии с «Правилами направления, рецензирования и опубликования научных статей в журнале «Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение», размещенными на сайте журнала www.journals.regmed.ru

Все статьи проходят рецензирование двумя рецензентами. Используется модель двойного слепого рецензирования.

Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописи не взимается. Ускоренная публикация не допускается.

Труды заочных конференций не публикуются.



Л. А. Тарасевич

Учредитель

Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы
средств медицинского
применения»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Издатель

Издательский дом «Фолиум»

Главный редактор

Олефир Ю. В.

Заместители**главного редактора**

Меркулов В. А.
Бондарев В. П.

Ответственный секретарь

Климов В. И.

Научный редактор

Лебединская Е. В.

Редактор

Шестакова А. П.

Члены редколлегии

Авдеева Ж. И.
Балаболкин И. И.
Борисевич И. В.
Воробьева М. С.
Гущин И. С.
Дармов И. В.
Иванов В. Б.
Игнатьев Г. М.
Леви Д. Т.
Медуницын Н. В.
Мовсисянц А. А.
Мосягин В. Д.
Хамитов Р. А.

Редакционный совет

Амвросьева Т. В. (Беларусь)
Борисевич С. В. (Сергиев Посад)
Брико Н. И. (Москва)
Волчков В. Е. (Франция)
Гинцбург А. Л. (Москва)
Дятлов И. А. (Оболensk)
Зверев В. В. (Москва)
Кутырев В. В. (Саратов)
Львов Д. К. (Москва)
Михайлов М. И. (Москва)
Покровский В. И. (Москва)
Савченко В. Г. (Москва)
Учайкин В. Ф. (Москва)
Хаитов Р. М. (Москва)
Чумаков К. М. (США)

СОДЕРЖАНИЕ**Обзоры**

Дизайн доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов:

особенности, ключевые принципы и требования 133

Современное состояние вопроса заболеваемости детей туберкулезом,

препараты для профилактики и диагностики инфекции 145

В. А. Аксенова, Д. Т. Леви, Н. В. Александрова, Д. А. Кудлай

Обзор методических подходов к оценке качества лекарственных средств на основе

рекомбинантных интерферонов 152

О. Б. Устинникова, Л. А. Гайдарова, М. Л. Байкова, Т. Н. Лобанова, И. М. Щербаченко,

Е. О. Голощапова, В. П. Бондарев

Оригинальные статьи

Разработка и валидация методики определения концентрации экулизумаба

в плазме крови человека с применением технологии биослойной интерферометрии 158

В. М. Симонов, М. С. Пантюшенко, А. А. Казаров, О. А. Маркова, Г. Н. Порошин

Оптимизация способов математической обработки калибровочных кривых

при оценке молекулярной массы биологических лекарственных средств 165

методом электрофореза в полиакриламидном геле с SDS

В. А. Томилин, Н. Л. Иванютина, Е. В. Эльберт, Р. А. Волкова

Использование qPCR для контроля отсутствия микоплазменной контаминации

в клеточных культурах 173

Н. Д. Ёлшин, А. В. Петров

Изучение диагностической значимости иммунореактивных эпитопов протеаз

семейства OmpTn с использованием пептидной библиотеки 190

В. А. Федорова, М. А. Хижнякова, С. С. Зайцев, А. М. Ляпина, Л. В. Саяпина,

Е. П. Ляпина, О. В. Ульянова, В. Л. Мотин

Методические подходы к доклинической оценке побочного действия

сывороточных иммунобиологических лекарственных препаратов 187

В. Н. Подкуйко, А. К. Яковлев, В. П. Краснянский, С. В. Борисевич, Н. К. Черникова,

Э. А. Яковлев, А. П. Пирожков, Д. Н. Лега, С. В. Назаров, Е. В. Гордеев,

Я. В. Полянский, Е. В. Рождественский, С. А. Нимирская

Хроника

Татьяна Ивановна Немировская (к 70-летию со дня рождения) 193

Илья Владимирович Дармов (к 65-летию со дня рождения) 194

Адрес редакции:

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 127051, Российская Федерация, Москва,
Петровский бульвар, д. 8, стр. 2.
Тел.: +7 495 234-61-04, +7 495 214-91-19 (доб. 63-35; 63-36). E-mail: biopreparaty@expmed.ru.

Издание зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство о регистрации средства
массовой информации ПИ № ФС77-53128 от 14 марта 2013 г.

Все права защищены. Любое воспроизведение опубликованных материалов без письменного со-
гласия редакции не допускается. При перепечатке ссылка на журнал обязательна.

Журнал включен в наукометрическую базу данных Science Index.

Подписано в печать 18.08.2017.

Подписной индекс **25120**

в каталоге «Газеты. Журналы» агентства «Роспечать».

Выходит один раз в три месяца.

Дизайн, верстка, печать: Издательский дом «Фолиум»





L. A. Tarasevich

Founder

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

Publisher

Folium Publishing Company

Editor-in-Chief

Olefir Yu. V.

Deputy Editor-in-Chief

Merkulov V. A.

Bondarev V. P.

Executive Secretary

Klimov V. I.

Science Editor

Lebedinskaya E. V.

Editor

Shestakova A. P.

Editorial Board

Avdeeva Zh. I.

Balabolkin I. I.

Borisevich I. V.

Darmov I. V.

Goushin I. S.

Ivanov V. B.

Ignatiev G. M.

Khamitov R. A.

Levi D. T.

Medunitsyn N. V.

Movsesyants A. A.

Mosyagin V. D.

Vorobieva M. S.

Editorial Council

Amvrosieva T. V. (Belarus)

Borisevich S. V. (Sergiev Posad)

Briko N. I. (Moscow)

Volchikov V. E. (France)

Gintsburg A. L. (Moscow)

Dyatlov I. A. (Obolensk)

Zverev V. V. (Moscow)

Kutyrev V. V. (Saratov)

Lvov D. K. (Moscow)

Mikhailov M. I. (Moscow)

Pokrovskiy V. I. (Moscow)

Savchenko V. G. (Moscow)

Uchaikin V. F. (Moscow)

Khaitov R. M. (Moscow)

Chumakov K. M. (USA)

CONTENTS

Reviews

Design of preclinical studies of biomedical cell products:

characteristics, key principles and requirements

E. V. Melnikova, O. V. Merkulova, A. A. Chaplenko, V. A. Merkulov 133

Current tuberculosis incidence among children; medicines for prevention

and diagnosis of TB

V. A. Aksenova, D. T. Levi, N. V. Aleksandrova, D. A. Kudlay 145

Review of methodological approaches to quality evaluation of recombinant

interferon products

O. B. Ustinnikova L. A. Gayderova, M. L. Baykova, T. N. Lobanova,
I. M. Shcherbachenko, E. O. Goloshchapova, V. P. Bondarev 152

Original Articles

Development and validation of a method for determination of Eculizumab concentration in human plasma by biolayer interferometry

V. M. Simonov, M. S. Pantushenko, A. A. Kazarov, O. A. Markova, G. N. Poroshin 158

Optimization of mathematical processing of calibration curves when determining

molecular mass of biologicals by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

V. A. Tomilin, N. L. Ivanyutina, E. V. Elbert, R. A. Volkova 165

Possibilities of qPCR control of mycoplasma contamination of cell cultures

N. D. Yolshin, A. V. Petrov 173

Evaluation of diagnostic potential of immunoreactive epitopes

of the OmpT protease family by using a peptide library

V. A. Feodorova, M. A. Khizhnyakova, S. S. Zaitsev, A. M. Lyapina, L. V. Sayapina,
E. P. Lyapina, O. V. Ulyanova, V. L. Motin 180

Methodological approaches to preclinical evaluation of immunobiological

serum products and their side effects

V. N. Podkuyko, A. K. Yakovlev, V. P. Krasnyansky, S. V. Borisevich, N. K. Chernikova,
E. A. Yakovlev, A. P. Pirozhkov, D. N. Lega, S. V. Nazarov, E. V. Gordeev,
Ya. V. Polyansky, E. V. Rozhdestvensky, S. A. Nimirskaya 187

Chronicle

Ilya Vladimirovich Darmov (on the 65th anniversary) 193

Tatyana Ivanovna Nemirovskaya (on the 70th anniversary). 194

Address of the Editorial Office:

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. Tel.: +7 495 234-61-04, +7 495 214-91-19 (ext. 63-35; 63-36).
E-mail: biopreparaty@expmed.ru.

Publication is registered by the Federal Service for Supervision in the Sphere of Telecom,
Information Technologies and Mass Communications. Certification of the Mass Media
Registration PI No. ФС77-53128 of March 14, 2013.

All rights reserved. No part of this publication may be used or reproduced
in any form or by any means without the prior written permission of the Publishers.
Reproducing any part of this material a reference to the journal is obligatory.

The publication data for the journal is August 18, 2017.

Publication is once every 3 months.

CRC preparation and printing: Folium Publishing Company.



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 большой животной-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 НК-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 опухоленность 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 $(1,0-5,0) \cdot 10^6$ клеток/кг массы тела $((0,7-3,5) \cdot 10^8$ 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, Гущина 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 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. 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.: Шумакова 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.

Чапленко 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: Чапленко 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, 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. 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, Rogulska 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 Transplantology 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-alpha 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

Современное состояние вопроса заболеваемости детей туберкулезом, препараты для профилактики и диагностики инфекции

В. А. Аксенова¹, Д. Т. Леви², Н. В. Александрова², Д. А. Кудлай³

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, 127994, Российская Федерация, Москва, ул. Достоевского, д. 4

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

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Институт повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства», 125371, Российская Федерация, Москва, Волоколамское шоссе, д. 91

Поступила 19.06.2017 г. Принята к публикации 04.07.2017 г.

Проведено изучение основных эпидемиологических показателей по туберкулезу у детей и подростков в России. Установлено, что показатель заболеваемости туберкулезом этой группы населения, несмотря на снижение, остается на высоком уровне. Показатель заболеваемости детей из контактов с бактериовыделителями превышает заболеваемость детей в целом по России в 30 раз, подростков — в 25 раз. У значительной доли заболевших детей и подростков из туберкулезных очагов выявляются микобактерии туберкулеза (МБТ) с множественной лекарственной устойчивостью, что требует пересмотра подходов к организации профилактических мероприятий у этой группы лиц. Значение туберкулиновой пробы Манту как диагностического теста у подростков невелико. Для скрининговых исследований у подростков и детей старше 7 лет используется Диаскинтест®, состоящий из двух специфичных для МБТ антигенов. Специфическая профилактика туберкулеза новорожденных проводится вакцинацией детей живыми вакцинами БЦЖ-М и БЦЖ. С целью уменьшения риска поствакцинальных осложнений, которые в значительной мере связаны с остаточной вирулентностью субштамма БЦЖ, проведено усовершенствование профилактического препарата: на 30 % снижено количество жизнеспособных клеток БЦЖ в 1 мг вакцины. С 2012 года регламентирован выпуск серий вакцины БЦЖ, содержащих в прививочной дозе от 500 тыс. до 1 млн., а серий вакцины БЦЖ-М — от 375 тыс. до 575 тыс. жизнеспособных клеток БЦЖ.

Ключевые слова: заболеваемость туберкулезом; микобактерии туберкулеза (МБТ); скрининговые иммунологические пробы (Манту и диаскинтест); вакцина БЦЖ; осложнения вакцинации.

Библиографическое описание: Аксенова ВА, Леви ДТ, Александрова НВ, Кудлай ДА. Современное состояние вопроса заболеваемости детей туберкулезом, препараты для профилактики и диагностики инфекции. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(3): 145–151.

По данным Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) туберкулез до настоящего времени продолжает оставаться глобальной проблемой здравоохранения в мире. Около трети населения земного шара уже инфицировано микобактериями туберкулеза, в будущем (по состоянию проблемы на сегодняшний день) 5–10 % из них заболеют туберкулезом. Около 1 миллиона заболевших — это дети в возрасте до 15 лет, что составляет более 10 % от всех новых случаев заболевания. В разных странах на долю детей приходится от 3 до 25 % общего числа заболевших туберкулезом [1].

Заболеваемость детей туберкулезом считается важным прогностическим эпидемиологическим показателем, отражающим общую эпидемическую ситуацию по туберкулезу в регионе. Туберкулез — проблема не только инфекционная, но в значительной мере проблема социально-биологическая. В условиях снижения иммунитета, связанного с низким уровнем жизни, стрессовой ситуацией, ВИЧ-инфекцией и др., несмотря на все проводимые мероприятия в борьбе с данной инфекцией, происходит активация латентной инфекции. В свою очередь, возбудитель

инфекции — микобактерия туберкулеза (МБТ) — способствует дальнейшему углублению иммунодефицитного состояния. К основной биологической проблеме относится способность микобактерий туберкулезного комплекса приспосабливаться к противотуберкулезным препаратам, довольно быстро приобретать устойчивость к большинству из них. Впервые это наглядно проявилось в конце прошлого века, когда на фоне значительного снижения заболеваемости в результате успешного применения новых эффективных противотуберкулезных препаратов ВОЗ выдвинула постулат «К 1990 году туберкулез будет побежден». Однако вместо этих радужных надежд мир имел драматический рост заболеваемости туберкулезом, который в ряде регионов был признан эпидемией. Коснулась эта проблема и нашей страны на фоне распада СССР. Помимо ухудшения социально-экономических условий, значительное влияние на рост заболеваемости в стране оказало значительное увеличение случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) за счет способности микобактерий быстро приспосабливаться к противотуберкулезным препаратам. Это привело к

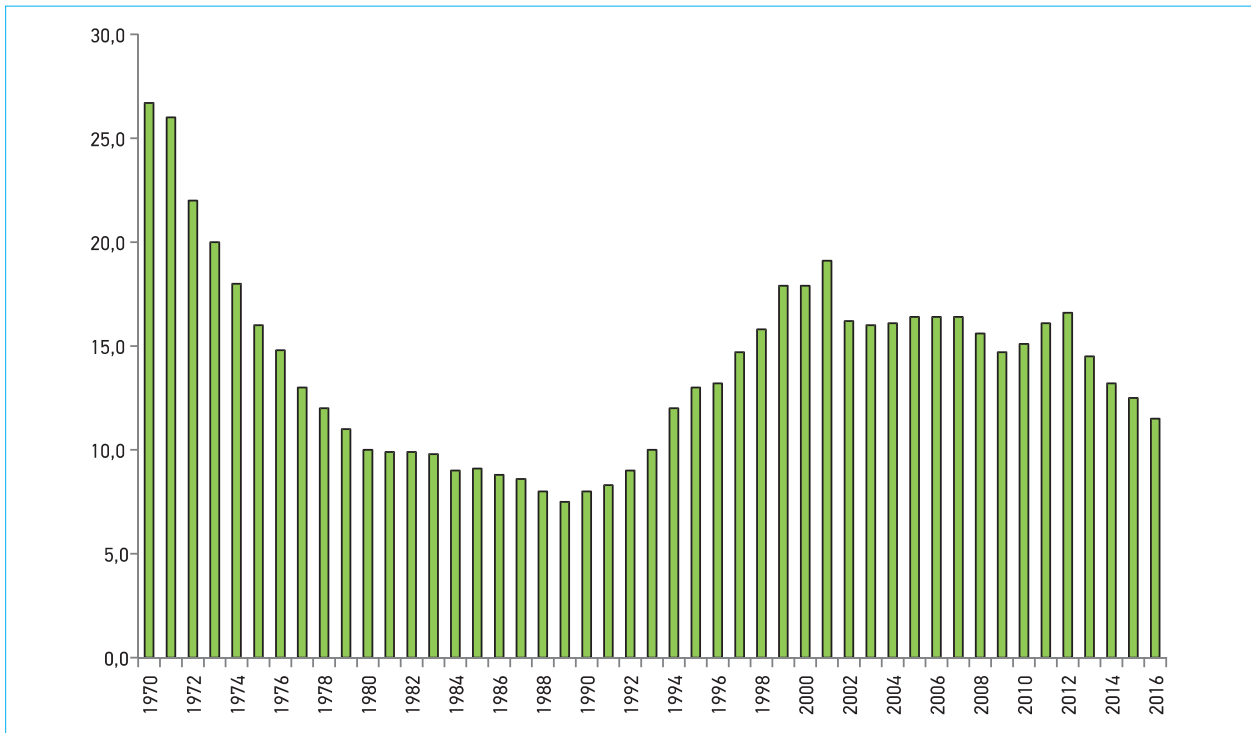


Рис. 1. Заболеваемость детей 0–14 лет, 1970–2016 гг. (Российская Федерация, источники: форма № 8, население — формы № 1 и № 4). По оси ординат — показатель заболеваемости детей на 100 тыс. детского населения.

увеличению числа лиц с хроническим течением заболевания, излечение которых сопряжено с большими трудностями [2, 3].

Дети как наиболее уязвимая группа населения первыми отвечают на негативные социально-экономические проблемы увеличением числа больных туберкулезом. В настоящее время во фтизиатрии для ранней диагностики заболевания активно используются новые научно-технические достижения: компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, иммунологические тесты *in vivo* и *in vitro*, ускоренные методы бактериологического подтверждения туберкулеза. Это способствует улучшению работы по раннему выявлению заболевания, стабилизации показателей заболеваемости и смертности от туберкулеза.

Проведенный анализ эпидемиологических показателей по туберкулезу в период с 1992 по 2016 год в целом по Российской Федерации (источники: формы Федерального статистического наблюдения № 8 и № 33, население — формы № 1 и № 4) показал рост регистрируемой заболеваемости туберкулезом детей к 2002 г. в 2,2 раза (с 9,4 до 19,1 на 100 тыс. детского населения). В последующие пять лет этот показатель незначительно снизился и оставался в пределах 95 % доверительного интервала на уровне 16,2–16,4 на 100 тыс. детей 0–14 лет [2], а затем при волнообразном колебании снизился к 2013–2014 годам до 14,3 и 13,2 соответственно (рис. 1).

К настоящему времени отмечена четкая тенденция к уменьшению числа детей, заболевших туберкулезом — показатель заболеваемости в 2016 году составил 11,5 на 100 тыс. В структуре заболевших преобладают дети 6–8 лет, что связано, как правило, с более тщательным профилактическим обследованием детей перед поступлением в школу, а также с отбором детей, подлежащих ревакцинации БЦЖ.

Особенностью течения туберкулеза у детей является способность организма к «самоизлечению» и последующим формированием петрификатов в лимфатических узлах и легочной ткани при недостаточно качественных профилактических осмотрах детского населения. В целом по стране ежегодно регистрируется около 3000 детей 0–14 лет с остаточными посттуберкулезными изменениями, выявляемыми при рентгенологическом обследовании по поводу положительной реакции на туберкулиновую пробу Манту (с 2 ТЕ) или на диаскинтест — внутрикожную пробу с 0,2 мкг аллергена туберкулезного рекомбинантного (Диаскинтест®) [4].

У детей в возрасте 15–17 лет преобладают вторичные формы туберкулеза с характерными рентгенологическими изменениями, нередко подтверждаемые бактериовыделением. Основным методом выявления туберкулеза у подростков является массовая флюорография. Большая часть подростков проходит профилактические осмотры в связи с обучением в организованном коллективе и необходимостью определения пригодности к военной службе. Заболеваемость туберкулезом у них регистрируется более достоверно, чем у детей 0–14 лет. Значение туберкулинодиагностики как диагностического теста в этой возрастной группе невелико [5].

Общезвестно, что самоизлечение от туберкулеза с формированием кальцинатов и рубцовых изменений в очаге поражения часто является неполноценным. У детей сохраняются признаки туберкулезной интоксикации, что может быть одной из причин развития хронически-текущего первичного или вторичного туберкулеза в подростковом периоде и у лиц молодого возраста. В будущем возможна реактивация процесса (особенно в подростковом и молодом возрасте), требующая хирургического лечения путем удаления больших остаточных посттуберкулезных изменений. Все это подтверждает необходимость пере-

смотра подходов к раннему выявлению туберкулеза в детском возрасте [6].

Клинические формы заболевания у детей характеризуются преобладанием поражения внутригрудных лимфатических узлов без вовлечения в процесс легочной ткани. У детей моложе 7 лет туберкулез протекает с поражением легочной ткани лишь в 9,2 %, у детей 7–14 лет — в 3 раза чаще, а у подростков — чаще почти в 10 раз (в 86,5 % случаев). Доля бактериовыделителей у детей 0–14 лет составляет только 4,3 %. У детей преобладает поражение внутригрудных лимфатических узлов, поэтому бактериовыделение не является основным критерием диагностики. Несмотря на то, что число детей и подростков с бактериовыделением невелико, обращает на себя внимание высокая доля лиц среди них, выделяющих микобактерии с МЛУ — 22,5 и 20,4 % соответственно [6].

Показатель заболеваемости детей и подростков из контактов с бактериовыделителями в последние годы превысил заболеваемость в этих возрастных группах в целом по России в 30 раз. На этом фоне число заболевших детей и подростков из туберкулезных очагов достигло 443,7 случаев в 2016 г. (1/10 от всех заболевших детей, число не предотвращенных случаев заболевания туберкулезом составляет 9,9 %). Высокая заболеваемость детей и подростков из туберкулезных очагов, значительная доля из которых, выделяет МБТ с МЛУ, требует пересмотра подходов к организации профилактических мероприятий у этой группы лиц.

Анализ работы в территориях по вопросам профилактического лечения показал, что, как правило, химиопрофилактика проводится одним противотуберкулезным препаратом в амбулаторных условиях, лечение осуществляется в короткие сроки, что недостаточно для предотвращения развития локального туберкулезного процесса. Это приводит лишь к ограничению специфического воспаления с формированием мелких кальцинатов, что ежегодно подтверждается количеством детей, у которых выявляется туберкулез в фазе кальцинации [2, 6].

Основными методами выявления туберкулеза у детей в настоящее время является массовая аллергодиагностика — внутрикожные пробы с аллергеном туберкулезным очищенным в стандартном разведении (2 ТЕ/0,1 мл туберкулина) и с аллергеном рекомбинантным туберкулезным в стандартном разведении 0,2 мкг/0,1 мл (Диаскинтест®). Согласно Приказу Минздрава России от 29.12.2014 г. № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания», обследованию с помощью пробы Манту с 2 ТЕ туберкулина (аллерген туберкулезный очищенный в стандартном разведении) подлежат все дети в возрасте до 7 лет (до первой ревакцинации БЦЖ), поскольку проба Манту позволяет судить о состоянии поствакцинозного иммунитета и проводить отбор на ревакцинацию лиц с отрицательной реакцией. Даны рекомендации о проведении дополнительно внутрикожной пробы с препаратом Диаскинтест® с целью дифференциальной диагностики поствакцинальной и инфекционной аллергии. С 7-летнего возраста скрининг на туберкулезную инфекцию у детей и подростков проводится также с помощью диаскинтеста [5].

Диаскинтест® является высокоспецифичным препаратом, содержащим два связанных между собой антигена (ESAT6-CFP10). Эти антигены входят в состав только вирулентных микобактерий туберкулезного комплекса и отсутствуют у *M. bovis* BCG. При проведении пробы Манту у детей до 7 лет положительная реакция на туберкулин может

быть как следствием вакцинации БЦЖ, так и инфицирования туберкулезом. Для дифференциальной диагностики в таких случаях дополнительно проводится диаскинтест. При отборе на ревакцинацию БЦЖ детей положительная реакция на туберкулиновую пробу является основанием для отвода от прививки.

Расширенные клинические и постмаркетинговые исследования показали, что метод диагностики с помощью постановки внутрикожной пробы с высокоспецифичным препаратом Диаскинтест®, которую в отличие от «пробы Манту» принято называть «диаскинтест», является перспективным для проведения скрининговых обследований на туберкулез [5]. Диаскинтест, как и проба Манту, прост в исполнении и не требует дополнительных затрат на дорогостоящее лабораторное оборудование, подобно тестам *in vitro* (тестам IGRA), высокая специфичность которых неоднократно подтверждалась [7–9]. Проведенные научные и клинические исследования показали, что диаскинтест также позволяет объективно и с высокой точностью выявлять лиц с высоким риском заболевания туберкулезом. Этот факт подтверждается официальными статистическими показателями.

Так, по итогам внедрения приказа Минздравсоцразвития России от 29.10.2009 г. № 855 «О внесении изменения в приложение № 4 к приказу Минздрава России от 21 марта 2003 г. № 109» в 2010 г. в 37 регионах Российской Федерации, а в 2011 г. во всех регионах страны Диаскинтест® стал использоваться при диагностике туберкулеза в условиях противотуберкулезной службы. По данным ряда авторов [4, 5, 10], у детей с латентной туберкулезной инфекцией (ЛТИ) положительная реакция на Диаскинтест® прямо коррелировала с наличием контакта с больными-бактериовыделителями, в отличие от детей, контактировавших с больными без бактериовыделения.

Анализ результатов диаскинтеста у детей, состоящих в I, IIIA и VI группах диспансерного учета ($n = 456102$) показал, что у больных с активными формами туберкулеза (I ГДУ) частота положительных реакций на диаскинтест составила более 90 %. У пациентов с впервые выявленными остаточными посттуберкулезными изменениями (IIIA ГДУ) — в 2/3 части случаев. У детей с измененной чувствительностью к туберкулину (VI ГДУ) положительные реакции выявлены в каждом третьем-четвертом случае [4].

Полученные результаты явились основанием для дальнейшего внедрения диаскинтеста в России как скринингового метода обследования на туберкулез [11].

Основным методом специфической профилактики туберкулеза у детей является вакцинация БЦЖ. Эффективность вакцинации БЦЖ за последние 2–3 десятилетия неоднократно подвергалась сомнению. Эффективность вакцинации колебалась по данным исследователей от 0 до 90 % в зависимости от технологии изготовления препарата и использованного в производстве субштамма БЦЖ, дозы вакцины, эпидситуации по туберкулезу, возраста прививаемых и др. [12, 13]. На основании данных различных исследователей ВОЗ было установлено, что прививка БЦЖ не защищает взрослых от туберкулеза легких, однако вакцинация в наиболее ранний период после рождения позволяет предотвратить тяжелые генерализованные формы заболевания у ребенка и смертность малышей от туберкулеза [14]. В настоящее время эффективность вакцинации БЦЖ исследователи оценивают на уровне 80 %.

Охват иммунизацией БЦЖ новорожденных детей в Российской Федерации имеет тенденцию к снижению.

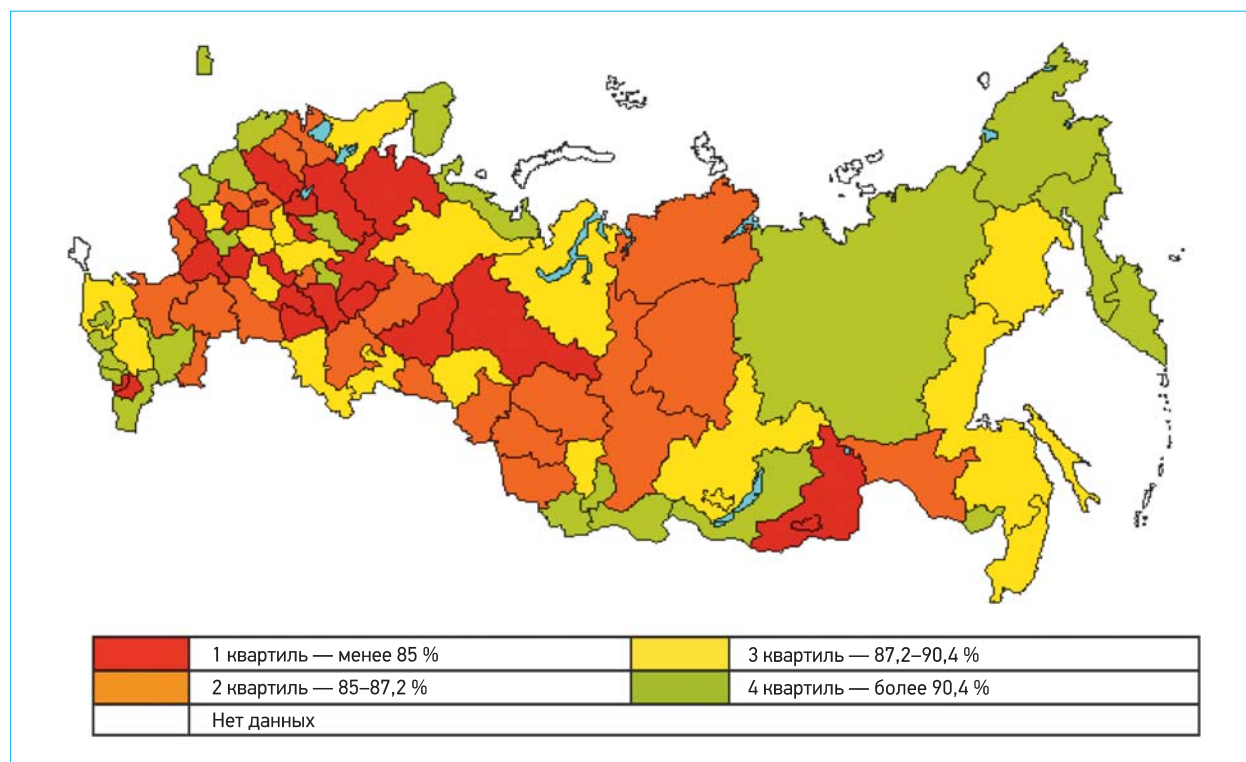


Рис. 2. Охват вакцинацией против туберкулеза в родильном доме (Российская Федерация; Федеральный Центр мониторинга туберкулеза. Форма № 32. 2015 г.).

Так, в 2009 г. в родильных домах вакцинированы 95,7 % новорожденных, а в 2014 — 85,5 % детей [2]. В некоторых регионах этот показатель не превышает 75 % (рис. 2). Негативное влияние на отказ от вакцинации оказывают некомпетентные публикации в прессе о вредном воздействии на организм ребенка любых вакцин. В развитых странах вакцинируют против туберкулеза новорожденных только в группах риска, так как заболеваемость туберкулезом не превышает несколько единиц на 100000, поэтому риск заражения невелик.

В нашей стране первой ревакцинации подлежат 15,1 % детей в возрасте 6–7 лет. Крайне низкий охват ревакцинацией БЦЖ обоснован высоким уровнем туберкулиноположительных детей. Вторая ревакцинация, которой подлежали только 3 % детей в возрасте 14 лет, была отменена в 2014 году [11].

Вакцина БЦЖ — живая вакцина, ее протективные свойства тесно связаны с остаточной вирулентностью субштамма, т.е. способностью БЦЖ размножаться внутриклеточно. Это же свойство вакцины приводит к реакции регионарных лимфатических узлов, в результате которой происходит их увеличение. Значительное увеличение лимфатического узла (1 см и более) является поствакцинальным осложнением — лимфаденитом. Частоту лимфа-

денитов в результате вакцинации принято считать «маркером» реактогенности вакцины. Известно, что «сильные» вакцины (вакцины из субштаммов БЦЖ с выраженной остаточной вирулентностью) дают больший защитный эффект, но и вызывают больше лимфаденитов [13]. Значительное количество регистрируемых в стране поствакцинальных лимфаденитов и других осложнений, в том числе таких серьезных, как оститы, послужили основанием для проведения специального исследования. В результате этого исследования выявлена прямая пропорциональная зависимость между числом жизнеспособных клеток в прививочной дозе и количеством поствакцинальных осложнений [15]. Было установлено, что серии вакцины БЦЖ и БЦЖ-М, показатели жизнеспособности которых находились в пределах от среднего до верхнего допустимого лимита, вызывают в два-четыре раза больше осложнений, чем серии с умеренным или низким содержанием жизнеспособных клеток БЦЖ в прививочной дозе.

Полученные данные позволили сделать вывод о необходимости значительного снижения верхней границы допустимого количества жизнеспособных клеток в туберкулезных вакцинах. На основании внесения изменений в спецификации фармакопейных статей препаратов с 2012 года предприятия-изготовители приступили к вы-

Таблица 1. Характеристика вакцин БЦЖ и БЦЖ-М, до и после изменения показателя специфической активности

Вакцина	В 1 ампуле препарата содержится			Количество жизнеспособных БЦЖ в одной дозе препарата	
	микобактерий БЦЖ, мг	количество доз	общее количество микобактерий в дозе, мг	содержалось до 01.01.2012 г.	содержится с 01.01.2012 г.
БЦЖ	0,5	10	0,05	от 500 тыс. до 1,5 млн.	от 500 тыс. до 750 тыс.
БЦЖ-М	0,5	20	0,025	от 500 тыс. до 1 млн.	от 375 тыс. до 575 тыс.

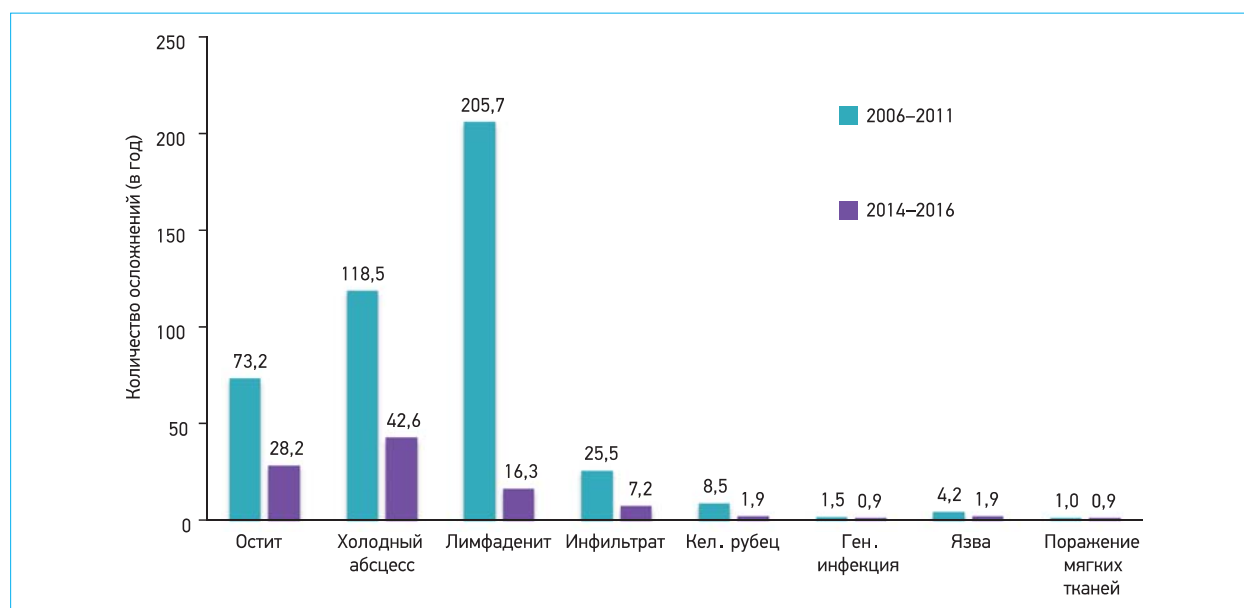


Рис. 3. Среднегодовое количество осложнений за 2 сравниваемых периода (по данным фармаконадзора).

пуску вакцин со сниженным на 1/3 количеством жизнеспособных клеток БЦЖ. В прививочной дозе вакцины БЦЖ в настоящее время содержится «от 500 тыс. до 1 млн.» вместо 500 тыс.–1,5 млн. жизнеспособных клеток БЦЖ.

Прививочная доза вакцины БЦЖ-М претерпела еще более значительные изменения: в прививочной дозе этого препарата содержится «от 375 тыс. до 575 тыс.» жизнеспособных клеток БЦЖ вместо «от 500 тыс. до 750 тыс.» (табл. 1). Несмотря на то, что эти изменения не выходили за пределы норм, принятых в НД, предварительно были проведены масштабные экспериментальные исследования на морских свинках. Эти испытания показали, что использование «новодозных» вакцин не снижает защитный эффект вакцинации при последующем заражении вирулентными штаммами МБТ у этих чувствительных к туберкулезу животных.

Оценка результатов внедрения этой коррекции показателя «Жизнеспособность вакцины БЦЖ» была проведена путем сравнения данных о количестве осложнений, зарегистрированных до (2006–2011 гг.) и после изменения характеристики специфической активности (2014–2016 гг.). Несмотря на отмеченное снижение числа поствакцинальных осложнений в 2012–2013 гг. данные фармаконадзора за эти годы не были взяты в разработку, так как в данный период на практике существовали одновременно оба варианта туберкулезных вакцин. На рисунке 3 представлены данные в виде среднегодового количества донесений в рамках фармаконадзора об осложнениях на вакцину БЦЖ и БЦЖ-М, суммарно по 2 предприятиям «НПО» Микроген» (г. Ставрополь) и филиала Мадгамал (Москва). Оценка этих результатов показала значительное снижение общего количества осложнений. Наибольшее влияние снижение жизнеспособных клеток БЦЖ в прививочной дозе оказало на регистрируемое количество поствакцинальных лимфаденитов. Известно, что лимфадениты являются маркером реактогенности вакцины, показателем остаточной вирулентности штамма. Среднегодовое количество лимфаденитов снизилось в 12,8 раз (с 205,7 до 16,3). Число инфильтратов уменьшилось в 3,5 раза, келоидных рубцов в 4, а оститов и холодных абсцессов — в 2,7 и 2,8 раза соответственно ($p > 0,95$).

Эти меры привели к значительному сокращению числа регистрируемых осложнений на вакцинацию против туберкулеза, в том числе таких серьезных, как оститы.

Достоверность различий количества таких осложнений, как генерализованная инфекция, язва на месте введения, поражение мягких тканей в сравниваемые периоды доказать не удалось в связи с единичностью случаев. Обращает на себя внимание значительное снижение (в 12,8 раз) случаев поствакцинальных лимфаденитов, что подтверждает — лимфадениты зависят от остаточной вирулентности субштамма

Обращает на себя внимание значительное снижение (в 12,8 раз) случаев развития поствакцинальных лимфаденитов. Это подтверждает тот факт, что степень остаточной вирулентности субштамма оказывает влияние на частоту развития лимфаденитов, поэтому уменьшение жизнеспособных клеток БЦЖ в дозе значительно снизило показатель этой формы осложнений. Количество оститов и холодных абсцессов также уменьшился, но влияние на это осложнение жизнеспособных клеток БЦЖ не столь значительно. Несколько в большей степени влияние остаточной вирулентности проявилось при анализе числа инфильтратов и келоидных рубцов. Известно, что от состояния организма ребенка зависит развитие келоидных рубцов, а причиной холодных абсцессов и инфильтратов, в основном, является нарушение техники прививки (например, внутрикожное введение препарата произведено несколько глубже регламентированного).

Результаты этого исследования подтверждают также необходимость ревизии обучения вакцинаторов, которое проводится ежегодно.

Выводы

1. Показатели заболеваемости туберкулезом детей во втором десятилетии XXI века в России и в мире снизились и имеют стойкую тенденцию к дальнейшему снижению.

2. Показатель заболеваемости детей из очагов туберкулезной инфекции продолжает сохраняться на высоком уровне. Значительно увеличилось число случаев впервые выявленного МЛУ туберкулеза.

3. Широкое внедрение внутрикожной пробы с препаратом аллерген туберкулезный рекомбинантный (Диаскинтест®) для скрининга позволяет своевременно выявлять инфицированных туберкулезом детей, нуждающихся в превентивном лечении.

4. Усовершенствованные препараты вакцины БЦЖ и БЦЖ-М со сниженным количеством жизнеспособных БЦЖ в прививочной дозе вызвали в 12,8 раз меньше лимфаденитов.

5. Количество оститов, холодных абсцессов, инфильтратов снизилось только в 2,7–3,5 раза, что еще раз подтвердило их зависимость в большей мере от техники введения препарата и состояния организма ребенка.

6. Необходима ревизия системы подготовки медперсонала, проводящего прививки против туберкулеза.

Литература

1. Global tuberculosis report 2016. 1. Tuberculosis — epidemiology. 2. Tuberculosis, Pulmonary — prevention and control.
2. Аксенова ВА. Туберкулез у детей и подростков в России к началу XXI века. Медицинский альянс 2013; (1): 46–9.
3. Богородская ЕМ, Белиловский ЕМ, Пучков КГ, Сенчихина ОЮ, Шамуратова ЛФ. Заболеваемость туберкулезом детей раннего возраста в городе Москве и факторы, влияющие на нее. Туберкулез и социально-значимые заболевания 2014; (5): 15–22.
4. Бармина НА, Барышникова ЛА, Шурыгин АА, Рейхардт ВВ. Скрининговое обследование детей и подростков III, IV и V групп здоровья с применением нового диагностического теста. Туберкулез и болезни легких 2015; (5): 40–1.
5. Слоговая ЛВ, Богородская ЕМ, Леви ДТ, Сельцовский ПП. 10 лет кожной пробе с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (Диаскинтест®) и 110 лет туберкулиновой пробе Манту — сравнение эффективности. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(2): 67–77.
6. Аксенова ВА, Севостьянова ТА. Туберкулез у детей и подростков в России. Лечащий врач 2013; (1): 35–9.
7. Слоговая ЛВ, Иванова ДА, Кочетков ЯА, Куликовская НВ, Ванеева ТВ, Филиппов АВ. Сравнительные результаты кожного теста с препаратом, содержащим рекомбинантный белок CFP-10-ESAT-6, и лабораторного теста QuantiFERON-GIT. Туберкулез и болезни легких 2012; (10): 27–32.
8. Diel R, Goletti D, Ferrara G, Bothamley G, Cirillo D, Kampmann B, et al. Interferon-γ release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis. Eur Respir J. 2011; 37(1): 88–99.
9. Diel R, Nienhaus A, Lodenkemper R. Cost-effectiveness of interferon-gamma release assay screening for latent tuberculosis infection treatment in Germany. Chest 2007; 131(5): 1424–34.
10. Поддубная ЛВ, Шилова ЕП, Степченко ИМ, Кононенко ВГ. Эпидемиологические факторы и иммунологические пробы в формировании групп риска по заболеванию туберкулезом. Туберкулез и болезни легких 2015; (5): 153–4.
11. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 декабря 2014 года № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания».
12. Baily GV. Tuberculosis prevention Trial, Madras. Indian J Med Res. 1980; 72 Suppl: 1–74.
13. Аксенова ВА, Леви ДТ. Туберкулезные вакцины. В кн.: Зверев ВВ, Семенов БФ, Хаитов РМ, ред. Вакцины и вакцинация. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. С. 371–411.
14. Леви ДТ, Александрова НВ, Севостьянова ТА, Подлипаева ИВ, Аксенова ВА, Рухамина МЛ. Осложнения после вакцинации против туберкулеза. Туберкулез и болезни легких 2013; (9): 10–5.
15. Guidance for national tuberculosis programmes on the management of tuberculosis in children Second Edition 2014 <https://goo.gl/mDCvXy>.

Об авторах

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, 127994, Российская Федерация, Москва, ул. Достоевского, д. 4. Аксенова Валентина Александровна. Главный внештатный детский специалист фтизиатр Минздрава России, председатель профильной комиссии, зав. отделом туберкулеза у детей и подростков НИИ ФП ПМГМУ им. И. М. Сеченова, д-р мед. наук, профессор.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Российская Федерация, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2. Леви Диана Тимофеевна. Главный эксперт управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор. Александрова Наталья Владимировна. Главный эксперт лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы и контроля МИБП, канд. мед. наук.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Институт повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства», 125371, Российская Федерация, Москва, Волоколамское шоссе, д. 91.

Кудлай Дмитрий Анатольевич. Профессор кафедры экономики и маркетинга, д-р мед. наук.

Адрес для переписки: Леви Диана Тимофеевна; Levi@expmed.ru

Current tuberculosis incidence among children; medicines for prevention and diagnosis of TB

V. A. Aksenova, D. T. Levi, N. V. Aleksandrova, D. A. Kudlay

¹ Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Research Institute of Phthiopulmonology, 4 Dostoevskogo street, Moscow 127994, Russian Federation

² 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

³ Federal State Budgetary Educational Institution of Continuing Professional Education «Professional Development Institution of the Federal Medical and Biological Agency», 91 Volokolamskoe Highway, Moscow 125371, Russian Federation

The article analyses main epidemiological parameters of tuberculosis (TB) in children and adolescents in Russia. It was demonstrated that the incidence rate in this population, though decreasing, is still high. The disease incidence in children and adolescents arising from contacts with people with active TB is 30 and 25 times higher than the overall incidence rate in children and adolescents in Russia, respectively. Analysis of TB lesions in a major proportion of children and adolescents shows multi-drug resistant strains of *Mycobacteria tuberculosis* (MTB), and this calls for revision of approaches to preventive actions for this population. The tuberculin Mantoux test is of limited value when it comes to diagnosing TB in adolescents. Screening in adolescents and children older than 7 years is performed using Diaskintest® containing two MBT-specific antigens. Specific TB prevention for newborns is performed by vaccination with BCG and BCG-M living vaccines. The product was modified by a 30 % reduction of the number of BCG living cells per 1 mg of vaccine in order to reduce postvaccinal complications largely associated with residual virulence of the BCG substrain. Since 2012 BCG vaccine lots have been standardized to contain from 500 thousand to 1 million viable BCG cells per BCG vaccine dose and from 375 thousand to 575 thousand viable BCG cells per BCG-M vaccine dose.

Key words: tuberculosis incidence; *Mycobacteria tuberculosis* (MTB); immunological screening tests (Mantoux and Diaskintest); BCG vaccine; postvaccinal complications.

For citation: Aksenova VA, Levi DT, Aleksandrova NV, Kudlay DA. Current tuberculosis incidence among children; medicines for prevention and diagnosis of TB. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(3): 145–151.

References

1. Global tuberculosis report 2016. 1. Tuberculosis — epidemiology.
2. Tuberculosis, Pulmonary — prevention and control.
3. Aksenova VA. Tuberculosis in children and adolescents in Russia at the beginning of the 21st century. *Medical Alliance* 2013; (1): 46–9 (in Russian).
4. Bogorodskaya EM, Belilovsky EM, Puchkov KG, Senchikhina OYu, Shamuratova LF. The incidence of tuberculosis in children of an early age in the city of Moscow and the factors influencing it. *Tuberculosis and Socially Significant Diseases* 2014; (5): 15–22 (in Russian).
5. Barmina NA, Baryshnikova LA, Shurygin AA, Reichardt VV. Screening of children and adolescents of III, IV and V health groups with the new medical test. *Tuberculosis and Lung Diseases* 2015; (5): 40–1 (in Russian).
6. Slogotskaya LV, Bogorodskaya EM, Levi DT, Seltsovsky PP. Comparison of efficacy of Diaskintest®, a skin test with a recombinant tuberculosis allergen, used for 10 years and Mantoux tuberculin sensitivity test used for 110 years. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(2): 67–77 (in Russian).
7. Aksenova VA, Sevostyanova TA. Tuberculosis in children and adolescents in Russia. *Lechaschi Vrach* 2013; (1): 35–9 (in Russian).
8. Slogotskaya LV, Ivanova DA, Kochetkov YaA, Kulikovskaya NV, Vaneeva TV, Filippov AV. Comparative results of skin test with recombinant CFP-10/ESAT-6 fusion protein preparation and laboratory test QuantiFERON-GIT. *Tuberculosis and Lung Diseases* 2012; (10): 27–32 (in Russian).
9. Diel R, Goletti D, Ferrara G, Bothamley G, Cirillo D, Kampmann B, et al. Interferon-γ release assays for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2011; 37(1): 88–99.
10. Diel R, Nienhaus A, Loddenkemper R. Cost-effectiveness of interferon-gamma release assay screening for latent tuberculosis infection treatment in Germany. *Chest* 2007; 131(5): 1424–34.
11. Poddubnaya LV, Shilova EP, Stepchenko IM, Kononenko VG. Epidemiologic factors and immunoassays in the formation of tuberculosis risk groups. *Tuberculosis and Lung Diseases* 2015; (5): 153–4 (in Russian).
12. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of 29.12.2014 № 951 «On approval of methodological recommendations for diagnosis and treatment of respiratory tuberculosis».
13. Baily GV. Tuberculosis prevention Trial, Madras. *Indian J Med Res*. 1980; 72 Suppl: 1–74.
14. Aksenova VA, Levi DT. Tuberculosis vaccines. In: Zverev VV, Semenov BF, Khaitov RM, eds. *Vaccines and vaccination. National guidance*. M.: GEOTAR-Media; 2011. P. 371–411 (in Russian).
15. Levi DT, Aleksandrova NV, Sevostyanova TA, Podlipaeva IV, Aksenova VA, Rukhamina ML. Complications after vaccination against tuberculosis. *Tuberculosis and Lung Diseases* 2013; (9): 10–5 (in Russian).
16. Guidance for national tuberculosis programmes on the management of tuberculosis in children Second Edition 2014 <https://goo.gl/mDCvXy>.

Authors

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Research Institute of Phthysipulmonology, 4 Dostoevskogo street, Moscow 127994, Russian Federation.

Aksenova VA. Chief independent specialist in TB in children working part-time for the Ministry of Health of Russia, chair of the respective Specialist Commission, head of the Department of Tuberculosis in Children and Adolescents of the Research Institute of Phthysipulmonology of Sechenov University. Doctor of Medical Sciences, professor.

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.

Levi DT. Chief expert of the Division for Expert Evaluation of Antibacterial MIBPs of the Centre for Evaluation and Control of MIBPs. Doctor of Medical Sciences, professor.

Aleksandrova NV. Chief expert of the Laboratory of Bacterial Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of MIBPs' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Federal State Budgetary Educational Institution of Continuing Professional Education "Professional Development Institution of the Federal Medical and Biological Agency", 91 Volokolamskoe Highway, Moscow 125371, Russian Federation

Kudlay DA. Professor of the Department of Economics and Marketing. Doctor of Medical Sciences.

Contact e-mail: Levi Diana Timofeevna; Levi@expmed.ru

Обзор методических подходов к оценке качества лекарственных средств на основе рекомбинантных интерферонов

О. Б. Устинникова, Л. А. Гайдарова, М. Л. Байкова, Т. Н. Лобанова,
И. М. Щербаченко, Е. О. Голощапова, В. П. Бондарев

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 15.06.2017 г. Принята к публикации 04.07.2017 г.

Представлен обзор методов, используемых для определения показателей качества лекарственных средств на основе рекомбинантных интерферонов (ИФН) альфа и бета. Показано, что применяемые на сегодняшний день методические подходы в целом обеспечивают надлежащий контроль качества этой группы препаратов. Однако, для унификации контроля и повышения эффективности и безопасности лекарственных препаратов рекомбинантных ИФН необходимо формирование основных требований к общим фармакопейным статьям (ОФС) на субстанции интерферонов альфа-2, бета-1, основанных на принципах гармонизации с требованиями Европейской фармакопеи и фармакопей государств-членов ЕАЭС и учитывающих современные тенденции развития российского рынка лекарственных средств.

Ключевые слова: интерферон рекомбинантный; субстанция; оценка качества; метод определения; пегилированные формы.

Библиографическое описание: Устинникова О.Б., Гайдарова Л.А., Байкова М.Л., Лобанова Т.Н., Щербаченко И.М., Голощапова Е.О., Бондарев В.П. Обзор методических подходов к оценке качества лекарственных средств на основе рекомбинантных интерферонов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2017; 17(3): 152–157.

Лекарственные средства, активным компонентом которых являются интерфероны, достаточно широко представлены на современном фармацевтическом рынке и используются в медицинской практике для лечения вирусных, онкологических и инфекционно-воспалительных заболеваний.

Интерфероны (ИФН) относятся к группе цитокинов и представляют собой белки глобулиновой природы, которые являются полифункциональными биорегуляторами широкого спектра действия. Основные биологические свойства интерферонов проявляются в их противовирусном, антипролиферативном и иммуномодулирующем действии.

В соответствии с Соглашением о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза (ЕАЭС), гармонизация требований к лекарственным средствам является необходимым процессом в условиях функционирования общего рынка лекарственных средств. Наличие опыта гармонизации фармакопей государств-членов ЕАЭС с требованиями Европейской фармакопеи (ЕФ) с одной стороны и недостаточность фармакопейных статей на различные группы лекарственных препаратов в Российской фармакопее с другой стороны, формируют необходимость разработки национальных фармакопейных требований к ряду препаратов, в том числе препаратов на основе рекомбинантных интерферонов [1, 2].

Основными видами рекомбинантных интерферонов, представленных на сегодняшний день на российском фармацевтическом рынке, являются: интерфероны альфа-2, бета-1, а также их пегилированные формы.

Цель работы — формирование основных требований к общим фармакопейным статьям на субстанции интерфе-

ронов альфа-2, бета-1, основанных на принципах гармонизации и учитывающих современные тенденции развития российского рынка лекарственных препаратов.

Показатели качества, обеспечивающие эффективность и безопасность субстанций на основе рекомбинантных ИФН, наиболее объективно можно оценить на уровне очищенного целевого белка до добавления вспомогательных веществ, в частности, стабилизаторов белковой природы, которые могут помешать идентификации основного белка [3].

Основными показателями качества, гарантирующими эффективность и безопасность лекарственных средств на основе интерферонов, независимо от типа рекомбинантного белка, являются:

- подлинность;
- количественное определение специфической противовирусной активности;
- количественное определение целевого белка;
- анализ чистоты и идентификация примесей.

Однако существующие между типами и подтипами интерферонов различия первичных структур и структур высокого порядка, а также индивидуальные особенности посттрансляционных модификаций внутри этой группы цитокинов, являются причиной различий в методических подходах к оценке вышеуказанных показателей [4–8].

Интерфероны альфа 2

Подлинность. Интерфероны альфа представляют собой белки, состоящие из 165 аминокислот и содержащие две дисульфидные связи: между остатками цистеина в 1-м и 98-м положениях и в 29-м и 138-м положениях. Молеку-

лярная масса негликозилированного белка составляет около 19240 Да. Подсемейства интерферона альфа-2а и альфа-2b различаются аминокислотами в положениях 23: лизин и аргинин соответственно.

Для подтверждения подлинности интерферона альфа-2а и альфа-2b Европейским директором по качеству лекарственных средств (EDQM) предусмотрены следующие препараты сравнения: стандартные образцы интерферона — Interferon alfa-2a CRS (I03203000) и Interferon alfa-2b CRS (I0320301) для оценки физико-химических показателей, подтверждающих подлинность методами изоэлектрического фокусирования, пептидного картирования и вертикального электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) [7]. Для количественного определения специфической противовирусной активности используют: Interferon alpha 2b, human, rDNA, E.coli-derived 2-ud WHO International Standart 1999 NIBSC, Code: № 95/566; Interferon alpha 2a, human, rDNA, derived 2-ud WHO International Standart 1999 NIBSC, Code: № 95/650 [7].

Кроме вышеуказанных методов, в части физико-химических показателей, подтверждающих подлинность, используют метод иммуноблотинга и метод обращенно-фазовой ВЭЖХ, также в сравнении с образцами CRS.

Надо отметить, что физико-химические методы, описанные выше и рекомендованные ЕФ, являются современными и информативными. Однако существует ряд лекарственных форм препаратов интерферона, в основном для наружного и местного применения (мази, гели, суппозитории, спреи и пр.), которые выпускают исключительно отечественные производители. В связи с особенностями пробоподготовки такого рода лекарственных форм, применение физико-химических методов, рекомендованных ЕФ для подтверждения подлинности, становится недоступным. В данном случае многие отечественные производители используют биологический метод определения подлинности ИФН с помощью реакции нейтрализации противовирусной активности с применением специфических поли- или моноклональных антител.

Реакцию нейтрализации противовирусной активности проводят в культуре клеток, чувствительных к ИФН, в присутствии индикаторного вируса. Испытуемый образец должен инактивироваться анти-интерфероновыми моноклональными или поликлональными антителами аналогично стандартному образцу [9].

При проведении испытаний необходимо:

- проверить выбранные антитела на чувствительность к исследуемому виду интерферона и определить их активность;
- использовать в испытании либо 1/10 титра препарата после определения его противовирусной активности, либо расчетную величину титра, определенную, исходя из номинальной активности испытуемого и стандартного образцов. Выбранная доза (титр) должна обеспечить четкую картину нейтрализации действия интерферона антителами при отсутствии таковой в контролях.

На сегодняшний день не полностью определены и унифицированы методические рекомендации к данному методу, требования к подбору нейтрализующих антител, их разведению, порядку проведения реакции и т.д. Необходимо в дальнейшем продолжить работу по совершенствованию методики с целью унификации и повышения качества контроля подлинности препаратов интерферона.

Особого внимания в структуре молекулы заслуживает N-концевой метионин, образующийся при синтезе рекомбинантного белка рибосомой бактериальной клетки, что

отличает его от эндогенного интерферона, который N-концевым аминокислотным остатком содержит цистеин, связанный дисульфидной связью с 98 цистеином белка. Поскольку данное отличие может влиять на иммуногенность и стабильность рекомбинантного белка, тенденция последнего времени — производство безметиониновых субстанций интерферона альфа. Для субстанций, заявленных как «безметиониновые», необходимым подтверждением подлинности является оценка N-концевой последовательности методом аминокислотного секвенирования.

Количественное определение специфической противовирусной активности. Для определения противовирусной (специфической) активности субстанций интерферона используют биологический метод на культуре клеток, рекомендованный ЕФ [5, 7, 8]. Проявление противовирусной активности является также одним из способов подтверждения подлинности препарата.

Метод основан на сравнении способности препарата ИФН защищать клетки от цитопатического эффекта вируса с той же способностью соответствующего международного стандарта или стандарта, откалиброванного в международных единицах (МЕ). При проведении испытаний используют клетки, чувствительные к интерферону альфа и к вирусу-индикатору. Выбор комбинации «клеточная культура/вирус» основывается на том, какая из них обеспечивает наиболее чувствительный ответ для данного типа интерферона в сравнении со стандартным образцом (СО). Наиболее часто используют следующие комбинации клетка/вирус: клетки почек быка Madin-Darby (MDBK), лимфоидные клетки человека Л-41, перевиваемые клетки почки эмбриона свиньи СПЭВ/вирус везикулярного стоматита (VSV); клетки линии Vero, Hep2C, L929, Л-41/вирус энцефаломиокардита эльштейна (EMCV), или иные.

Учет активности интерферона возможно осуществлять визуально (микроскопически). Применяют также инструментальный способ учета результатов, рекомендованный ЕФ, с использованием селективного окрашивания живых клеток, защищенных интерфероном от действия вируса, элюирования красителя, фотометрирования оптической плотности элюата и последующей компьютерной обработки результатов.

Несмотря на многолетний опыт использования данной методики для определения специфической активности препаратов интерферона, остается необходимость уточнения методических рекомендаций в части адекватного выбора стандартных образцов, пробоподготовки, рабочих разведений, наиболее чувствительных комбинаций клетка/вирус, состава среды для анализа, оптимальных по времени условий проведения анализа, способа учета результатов анализа и т.д.

Количественное определение целевого белка. Количественное определение целевого белка в препаратах интерферонов альфа традиционно проводят методом Лоури, где в качестве стандартного раствора используют раствор бычьего сывороточного альбумина, а также методом ВЭЖХ или другим пригодным методом [7].

Анализ чистоты и идентификация примесей. Испытания на чистоту и примеси заключаются в оценке содержания специфических и неспецифических примесей.

К специфическим примесям относят низкомолекулярные белки интерфероновой природы (димеры, олигомеры) — примеси с молекулярной массой, отличной от интерферона альфа-2, а также продукты деградации ИФН (окисленные формы) — родственные белки.

Для оценки низкомолекулярных белков применяют метод вертикального электрофореза в ПААГ с натрия додецилсульфатом с использованием в качестве стандартного раствора Interferon alfa CRS соответствующего подтипа и стандарта молекулярных масс в диапазоне от 15 до 67 кДа.

На электрофореграмме определяют интенсивность, подвижность и ширину полос испытуемого раствора и раствора стандартного образца. Молекулярную массу вычисляют путем сравнения с маркерными белками с известными молекулярными массами. Основная полоса на электрофореграмме испытуемого раствора должна соответствовать основной полосе на электрофореграмме раствора стандартного образца CRS соответствующего подтипа [7].

Окисленные формы анализируют с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ, применяя пероксид водорода для обработки исследуемого образца.

К неспецифическим примесям относят белки и ДНК штамма-продуцента. Белки штамма-продуцента обычно определяют методом количественного иммуоферментного анализа (ИФА), используя коммерческие тест-системы. Также при проведении ИФА возможно использование реагентов, получаемых самим производителем. Однако данные методики, как и любые другие, нуждаются в предварительной валидации — оценке пригодности системы для решения конкретной задачи.

ДНК штамма-продуцента традиционно определяют методом молекулярной гибридизации с зондами, мечеными биотином, диоксигенином или другой меткой [9, 10]. В настоящее время существует тенденция отказа от данной методики в пользу других, более современных методов, при условии подтверждения их пригодности.

Также к неспецифическим примесям можно отнести бактериальные эндотоксины, которые традиционно определяют с помощью ЛАЛ-теста.

Суммируя вышесказанное, может быть рекомендован следующий перечень показателей и методов, необходимых для оценки качества лекарственных средств на основе рекомбинантного интерферона альфа:

1. Подтверждение подлинности методами изoeлектрического фокусирования, пептидного картирования, вертикального электрофореза в полиакриламидном геле, иммуоблотинга, обращенно-фазовой ВЭЖХ, с помощью реакции нейтрализации противовирусной активности специфическими антителами.
2. Установление N-концевой последовательности методом аминокислотного секвенирования (для безметиониновых форм).
3. Количественное определение специфической противовирусной активности биологическим методом.
4. Количественное определение целевого белка методом ВЭЖХ или любым другим пригодным методом.
5. Определение специфических примесей:
 - примеси с молекулярной массой, отличной от интерферона альфа-2 методом вертикального электрофореза в ПААГ;
 - родственные белки (окисленные формы) методом обращенно-фазовой ВЭЖХ.
5. Определение неспецифических примесей (любым пригодным методом):
 - белки штамма-продуцента;
 - ДНК штамма-продуцента;
 - бактериальные эндотоксины.

Интерфероны бета-1

Подлинность. Эндогенный интерферон бета представляет собой белок, состоящий из 166 аминокислотных остатков с одной внутрицепочечной дисульфидной связью, имеющий один сайт N-гликозилирования по аспарагиновому остатку в позиции 80 и цистеин в позиции 17. В настоящее время 6 гликоформ, обусловленных дифференциальным гликозилированием сайта и отличающихся количеством олигосахаридов и степенью их сialiрирования, идентифицированы как интерферон бета-1а. Для оценки подлинности интерферона бета-1а Европейским директором по качеству лекарственных средств предусмотрены: препарат сравнения — стандартный образец интерферона Interferon beta-1a CRS (Y0001101) для подтверждения физико-химических показателей подлинности методами масс-спектрометрии и пептидным картированием (ВЭЖХ), а также стандартный образец Interferon beta (Human, rDNA, Glycosylated), NIBSC, code: 00/572 для определения биологических показателей [8, 11, 12].

Метод масс-спектрометрии используют для оценки распределения изоформ (гликоформ): типичный спектр состоит из 6 основных гликоформ по степени их сialiрирования и (или) количеству участвующих в гликозилировании олигосахаридов (antennarity). Масс-спектр испытуемого препарата должен соответствовать масс-спектру стандартного образца [8].

При проведении пептидного картирования стандартный и испытуемый раствор подвергают обработке эндопротеазой LysC в одних и тех же условиях и далее проводят испытание методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [8].

Рекомбинантный интерферон бета-1b выделяют из клеток *Escherichia coli*, в геном которых внедрен ген человеческого интерферона бета, кодирующий аминокислоту серин в 17-й позиции. Интерферон бета-1b представляет собой негликозилированный белок с молекулярной массой 18500 Да, состоящий из 165 аминокислот и не содержащий N-концевого метионина. В качестве образца сравнения для определения биологической специфической активности предусмотрен Working Standard Interferon beta ser17 mutein (Human, rDNA derived), NIBSC, code: 00/574 [8].

Существенные отличия структуры интерферона бета-1b от структуры интерферона бета-1а, как было показано выше, а также отсутствие соответствующего стандартного образца CRS для подтверждения качества по физико-химическим показателям, обуславливают следующие особенности оценки качества: исключается метод масс-спектрометрии для подтверждения распределения изоформ, характеризующих структуру гликозилирования; необходимо подтверждение отсутствия гликозилирования; а также подтверждение наличия серина в позиции 17 и отсутствия метионина в N-концевой части белка.

Референтным препаратом интерферона бета-1b, зарегистрированным в Российской Федерации, является Бетаферон, производства «Шеринг АГ», Германия [11].

В связи с отсутствием международного стандартного образца интерферона бета-1b, целесообразно в качестве образца сравнения использовать референтный препарат или собственную субстанцию, охарактеризованную как стандартный образец предприятия (СОП), с обязательным полным исследованием первичной структуры белка и структур высокого порядка для подтверждения наличия серина в позиции 17, отсутствия метионина в N-концевой части и отсутствия гликозилирования.

Также для подтверждения подлинности может быть использован метод иммуноферментного анализа.

Для количественного определения специфической противовирусной активности интерферона бета-1 используют метод, описанный выше для интерферонов альфа-2а и альфа-2в в сравнении с соответствующими стандартными образцами.

Количественное определение целевого белка.

Традиционно количественное определение белка интерферона бета-1а проводят методом ВЭЖХ в сравнении со стандартным образцом. Количественное определение белка интерферона бета-1b целесообразно проводить методом Лоури в сравнении со стандартным раствором, приготовленным на основе бычьего сывороточного альбумина.

Анализ чистоты и идентификация примесей.

Классификацию примесей и их идентификацию проводят аналогично интерферону альфа. Для оценки специфических примесей для интерферона бета-1а в качестве стандартного образца используют раствор интерферона бета-1а CRS. Анализ чистоты и примесей интерферона бета-1b из-за отсутствия образца сравнения сопряжен с определенными сложностями. Приемлемым решением в данном случае может быть использование собственной субстанции, охарактеризованной как стандартный образец предприятия (СОП) или интерферона бета-1а CRS с учетом различий и доказательством возможности его использования в каждом конкретном случае.

Пегилированные формы

В настоящее время существует ряд различных методов модификации терапевтически значимых белков (в частности, интерферонов). Одним из наиболее эффективных является химическая модификация белка полиэтиленгликолем (ПЭГ), так называемое пегилирование [13]. Она заключается в физико-химической трансформации, достигаемой соединением нативной молекулы белка с ПЭГ. Применение этого метода позволяет значительно повысить терапевтическую эффективность фармакологических препаратов пептидной структуры и обеспечить их пролонгированное действие.

Для пегилированных интерферонов оценка качества, помимо полной характеристики целевого белка, должна заключаться в анализе характеристик полимера и конъюгата. Для полимера необходима оценка всех показателей качества, предусмотренная нормативным документом на реагент, включая полидисперсность массы.

Характеристика конъюгированного интерферона должна включать: степень модификации (среднее число молекул полимера, связанных с белком); расположение участков пегилирования; конформационную структуру, включая общий размер молекулы; количественное определение свободного, неконъюгированного белка; остаточные количества свободного полимерного реагента; молярное отношение полимера к белку.

Структура такого белка может быть описана следующим образом: «тип белка» конъюгирован с «название полимера» в степени замещения «*n* молей полимера/моль белка», с указанием средней молекулярной массы конъюгата и части белковой массы.

Если определение какой-либо характеристики методически недоступно, это должно быть отражено в пояснительных материалах. Дополнительными характеристиками сопоставимости пегилированных белков в этом случае

может быть сравнение изоформ (при их релевантности) или различий их активности, молярной активности конъюгата по сравнению с незамещенным белком и т.д. [14].

Выводы

Анализ методических подходов к определению показателей качества лекарственных средств на основе рекомбинантных интерферонов выявил, что в ряде случаев базовой оценки качества, рекомендованной и обеспеченной EDQM, может быть недостаточно. Таким образом, возникает ряд вопросов, требующих дополнительного рассмотрения.

1. Подтверждение подлинности ряда лекарственных форм препаратов интерферона альфа-2 (мази, гели, суппозитории, спреи и пр.) в реакции нейтрализации противовирусной активности.

2. Подтверждение N-концевой последовательности безметиониновых субстанций.

3. Уточнение выбора стандартных образцов, рабочих разведений, способов пробоподготовки, оптимальных с точки зрения чувствительности комбинаций клетка/вирус и т.д. для методики определения специфической противовирусной активности субстанции интерферона альфа-2.

4. Оценка качества интерферона бета-1b в части установления подлинности, анализа чистоты и идентификации примесей, в связи с отсутствием стандартного образца EDQM, требует в каждом конкретном случае обоснованного выбора стандартного образца сравнения.

5. Особенности оценки качества пегилированных форм интерферонов, базирующиеся на последних документах EMEA, однако не нашедшие отражения в Европейской фармакопее, требуют дополнительного изучения.

6. Необходимо формирование ОФС на субстанции интерферонов альфа-2, бета-1, основанных на принципах гармонизации с требованиями фармакопей государств-членов ЕАЭС и Европейской фармакопей.

Литература

1. Федеральный закон «О ратификации Соглашения о единых принципах и правилах обращения медицинских изделий (изделий медицинского назначения и медицинской техники) в рамках Евразийского экономического союза» № 4-ФЗ от 31.01.2016 г.
2. ICH Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological / Biological Products. International Conference on Harmonisation. 1999. Available from: <https://goo.gl/CYCLvi>.
3. Волкова РА, Авдеева ЖИ, Эльберт ЕВ, Алпатова НА, Борисевич ИВ. Требования к характеристике экспрессирующей конструкции и очищенного белка при проведении доклинических испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов генной инженерии. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2011; (3): 49–52.
4. Олфиг ЮВ, Медуницын НВ, Авдеева ЖИ, Мовсисянц АА, Меркулов ВА, Бондарев ВП. Современные биологические/биотехнологические лекарственные препараты. Актуальные вопросы разработки и перспективы использования. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (2): 67–77.
5. Алпатова НА, Гайдарова ЛА, Яковлев АК, Мотузова ЕВ, Лысикова СЛ, Солдатов АА, Авдеева ЖИ. Особенности определения специфической активности биотехнологических лекарственных средств. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17 (1): 13–26.
6. Остерман ЛА. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука; 1981.

7. Interferon alfa-2 concentrated solution. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
8. Interferon beta-1a concentrated solution. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
9. МУК 4.1/4.2.588–96 «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям».
10. ОФС. 1.7.1.0007.15. Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. 2016. С. 521–41.
11. Betaferon®: 25 Jahre Multiple Sklerose Forschung. Berger T, Linnebank M, Wiendl H, eds. Springer; 2013.
12. Murdoch DI, Lyseng-Williamson KA. Spotlight on Subcutaneous Recombinant Interferon- β -1a (Rebif®) in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *BioDrugs*. 2005; 19(5): 323–25.
13. Mero A, Clementi C, Veronese FM, Pasut G. Covalent conjugation of poly(ethylene glycol) to proteins and peptides: strategies and methods. *Methods Mol Biol*. 2011; 751: 95–129.
14. Guidance on the description of composition of pegylated (conjugated) proteins in the SPC (EMA/CPMP/BWP/3068/03). European Medicines Agency. Available from: <https://goo.gl/GUC2Le>.

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.

Устинникова Ольга Борисовна — начальник лаборатории биохимии МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. биол. наук.

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

Байкова Марина Леонидовна, эксперт 2 категории лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Лобанова Татьяна Николаевна, ведущий эксперт лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Щербаченко Ирина Михайловна, ведущий эксперт лаборатории биохимии МИБП Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Голощапова Евгения Олеговна, эксперт 2 категории лаборатории биохимии МИБП Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Бондарев Владимир Петрович, Директор Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук.

Адрес для переписки: Устинникова Ольга Борисовна; Ustinnikova@expmed.ru

Review of methodological approaches to quality evaluation of recombinant interferon products

O. B. Ustinnikova L. A. Gayderova, M. L. Baykova, T. N. Lobanova,
I. M. Shcherbachenko, E. O. Goloshchapova, V. P. Bondarev

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

The article summarises methods used to control the quality of recombinant interferon alpha and beta (IFNs) products. It demonstrates that currently used methodological approaches generally ensure proper quality control of this group of medicines. However, it is necessary to formulate basic requirements for the pharmacopoeial general chapters on interferon alpha-2 and beta-1 products in order to standardize the control procedures and increase the efficacy and safety of recombinant IFNs products. These requirements should be harmonized with requirements of both the European Pharmacopoeia and pharmacopoeias of the Eurasian Economic Union member-states, and should take account of the current trends in the Russian pharmaceutical industry.

Key words: recombinant interferon; substance; quality control; test methods; pegylated forms.

For citation: Ustinnikova OB, Gayderova LA, Baykova ML, Lobanova TN, Shcherbachenko IM, Goloshchapova EO, Bondarev VP. Review of methodological approaches to quality evaluation of recombinant interferon products. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(3): 152–157.

References

1. Federal law «On Ratification of the Agreement on Uniform Principles and Rules for the Treatment of Medical Devices (Medical Devices and Medical Equipment) within the Framework of the Eurasian Economic Union» № 4-FZ of January 31, 2016 (in Russian).
2. ICH Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological / Biological Products. International Conference on Harmonisation. 1999. <https://goo.gl/CYCLvi>.
3. Volkova RA, Avdeeva Zhl, El'bert EV, Alpatova NA, Borisevich IV. The requirements to characteristics of expressing structure and refined protein for performing preclinical trials of new immunobiological preparations, derived using gene engineering methods. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2011; 3: 49–52 (in Russian).
4. Olefir YuV, Medunitsyn NV, Avdeeva Zhl, Soldatov AA, Movsesyants AA, Merkulov VA, Bondarev VP. Modern biological/biotechnological medicinal products. Topical issues and prospects for development. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (2): 67–77 (in Russian).
5. Alpatova NA, Gayderova LA, Yakovlev AK, Motuzova EV, Lysikova SL, Soldatov AA, Avdeeva Zhl Assessment of biotechnological products specific activity. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017. 17 (1): 13–26 (in Russian).
6. Osterman LA Methods for studying proteins and nucleic acids. M.: Nauka; 1981 (in Russian).
7. Interferon alfa-2 concentrated solution. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.

8. *Interferon beta-1a concentrated solution*. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
9. MYK 4.1/4.2.588–96 «Methods of monitoring medical immunobiological drugs administered to people» (in Russian).
10. OFS. 1.7.1.0007.15. Medicines obtained by recombinant DNA methods. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. 2016. P. 521–41.
11. *Betaferon®. 25 Jahre Multiple Sklerose Forschung*. Editors: Thomas Berger, Michael Linnebank, Heinz Wiendl. ISBN: 978-3-7091-1765-1 (Print), 978-3-7091-1766-8 (Online).
12. Murdoch D1, Lyseng-Williamson KA. Spotlight on Subcutaneous Recombinant Interferon- β -1a (Rebif®) in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *BioDrugs*. 2005, 19, (5): 323–325.
13. Mero A, Clementi C, Veronese FM, Pasut G. Covalent conjugation of poly(ethylene glycol) to proteins and peptides: strategies and methods. *Methods Mol Biol*. 2011. 751:95–129.
14. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues (EMA/CPMP/BWP/3068/03). European Medicines Agency. Available from: <https://goo.gl/GUC2Le>.

Authors

Ustinnikova OB. Head of the Laboratory of MIBPs Biochemistry of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

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

Baykova ML. 2nd professional category expert of the Immunology Laboratory of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.

Lobanova TN. Leading expert of the Immunology Laboratory of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Shcherbachenko IM. Leading expert of the Laboratory of MIBPs Biochemistry of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Goloshchapova EO. 2nd professional category expert of the Laboratory of MIBPs Biochemistry of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.

Bondarev VP. Director of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences.

Contact e-mail: Ustinnikova Olga Borisovna; Ustinnikova@expmed.ru

Разработка и валидация методики определения концентрации экулизумаба в плазме крови человека с применением технологии биослойной интерферометрии

В. М. Симонов¹, М. С. Пантюшенко¹, А. А. Казаров¹, О. А. Маркова², Г. Н. Порошин¹

¹ Общество с ограниченной ответственностью

«Международный биотехнологический центр «Генериум»,

601125, Российская Федерация, Владимирская область, пос. Вольгинский, ул. Владимирская, 14

² АО «Генериум», 123317, г. Москва, ул. Тестовская, д. 10, оф. 214

Статья поступила 03.08.2017 г. Принята к публикации 04.08.2017 г.

Разработана и валидирована методика определения концентрации препарата моноклонального терапевтического антитела экулизумаб в плазме крови человека в диапазоне концентраций 3–250 мкг/мл. Методика основана на взаимодействии иммобилизованного Fab-фрагмента антитела, специфичного к экулизумабу в образце плазмы крови. Методика использует принцип биослойной интерферометрии, позволяющий без внесения дополнительных меток оценить концентрацию анализируемого вещества. Результаты валидации методики сопоставлялись с результатами валидации альтернативной методики на основе иммуноферментного анализа. По итогам исследования показано преимущество методики на основе биослойной интерферометрии по основным метрологическим характеристикам — аналитическому диапазону, правильности, прецизионности и селективности.

Ключевые слова: моноклональное антитело; экулизумаб; биослойная интерферометрия; валидация.

Библиографическое описание: Симонов ВМ, Пантюшенко МС, Казаров АА, Маркова ОА, Порошин ГН. Разработка и валидация методики определения концентрации экулизумаба в плазме крови человека с применением технологии биослойной интерферометрии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2017; 17(3): 158–164.

Экулизумаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело к компоненту комплемента C5 человека и применяется для терапии ультра-орфанного заболевания — пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ, PNH — Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria). Причиной ПНГ является соматическая мутация гена PIG-A [1]. Поэтому, несмотря на высокую эффективность, терапия экулизумабом не позволяет достичь полного излечения ПНГ. Тем не менее, как в клинических исследованиях, так и при последующем использовании препарата было показано, что применение экулизумаба для пациентов с ПНГ приводит к значительному уменьшению частоты клинических проявлений заболевания и повышению качества и продолжительности жизни пациентов [2]. В Российской Федерации терапия ПНГ экулизумабом применяется недостаточно широко в связи с крайне высокой стоимостью единственного зарегистрированного препарата экулизумаба — Солирис®. Улучшение ситуации возможно при выводе на отечественный фармацевтический рынок экономически доступного биоаналога, не уступающего оригинальному препарату в эффективности и безопасности. Для доказательства соответствия критериям эффективности и безопасности необходима оценка параметров фармакокинетики оригинального и воспроизведенного (биоаналогичного) препаратов. Основным способом оценки параметров фармакокинетики являются методы определения концентрации препаратов в биологической среде организма человека — крови или полученной из нее плазмы.

В данной публикации представлены результаты разработки и валидации методики оценки концентрации экулизумаба в плазме крови человека на основе биослойной интерферометрии. Поскольку ранее был разработан и ва-

лидирована аналогичная методика на основе иммуноферментного анализа, то становится возможным сделать сравнительный анализ преимуществ и недостатков этих двух подходов.

Материалы и методы

Материалы

Для разработки и валидации методов были использованы: растворы препарата Солирис® (концентрат экулизумаба для приготовления раствора для инфузий 10,0 мг/мл, производство «Alexion Pharma International Sarl», серия P0003703); оптические биосенсоры Dip and Read™ Anti-Penta-HIS (HIS1K), Pall ForteBio (лот 6090046); деплетированная по компоненту C5 системы комплемента сыворотка крови человека, Quidel (кат. № A501); Fab-фрагмент антитела, специфичного к экулизумабу с C-концевым гексагистидиновым тагом (далее анти-экулизумаб Fab-фрагмент); C5 Protein (компонент C5 комплемента человека), Quidel (кат. № A403); мышинные моноклональные антитела к иммуноглобулинам человека IgG4, конъюгированные с пероксидазой хрена, «Abscam» (кат. № ab98817); препарат Пролиа® (раствор деносумаба для подкожного введения, 60 мг/мл, «Amgen Manufacturing Limited», серия 0010262911); плазма крови человека 10 здоровых доноров.

Метод иммуноферментного анализа. Метод определения концентрации экулизумаба основан на специфическом взаимодействии препарата, содержащегося в образце, и предварительно сорбированного на 96-луночном микропланшете MaxiSorp с высокосорбирующей поверхностью («Nunc») компонента C5 комплемента человека с образованием комплекса, который детектируется с помощью мышинных моноклональных антител, конъюгирован-

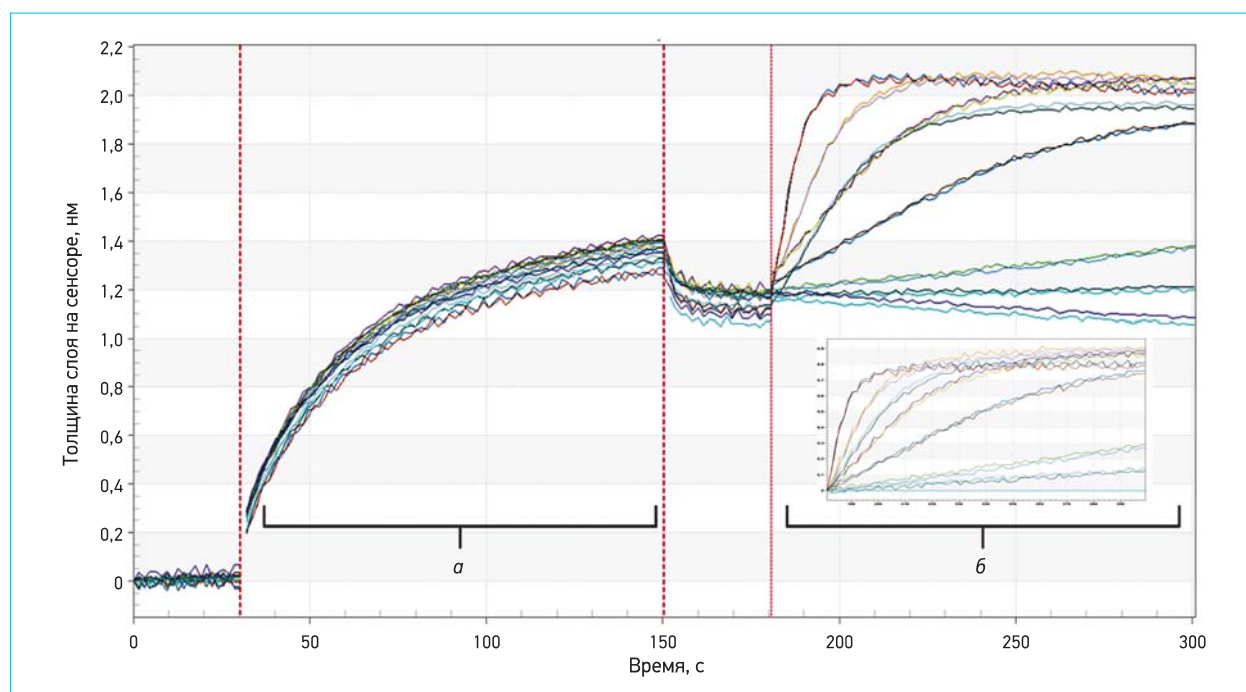


Рис. 1. Сенсограммы (а) иммобилизации на сенсорах анти-экулизумаб Fab-фрагмента и (б) доз-зависимого накопления комплекса на сенсорах.

ных с пероксидазой хрена, к иммуноглобулинам человека изотипа IgG4. После иммобилизации на микропланшете компонента C5 комплемента человека и блокирования несвязавшихся сайтов (использовали фосфатно-солевой буферный раствор («Эко-сервис»), содержащий 1 %-ный бычий сывороточный альбумин («Sigma»)), в лунки микропланшета вносили образцы стандарта и испытуемые образцы.

Для приготовления градуировочных растворов препарат экулизумаб разбавляли фосфатно-солевым буферным раствором, содержащим 0,1 % деплетированной по компоненту C5 системы комплемента сыворотки крови человека, в концентрации от 0,078 до 10 нг/мл. Испытуемые образцы плазмы крови человека разбавляли тем же буферным раствором с кратностью 1/1000 или более.

После инкубирования и промывки сформировавшийся в лунках комплекс C5–экулизумаб детектировали путем добавления вторичных антител (мышинных моноклональных антител к иммуноглобулинам человека IgG4, конъюгированных с пероксидазой хрена). Далее для визуализации комплекса C5–экулизумаб–вторичное антитело добавляли раствор тетраметилбензидина (хромогенный субстрат пероксидазы хрена). После развития окраски ферментативную реакцию останавливали путем добавления 0,5 М раствора серной кислоты. Оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм регистрировали с помощью микропланшетного спектрофотометра xMark («Bio-Rad»).

Вычисляли концентрацию экулизумаба в испытуемых образцах с использованием калибровочной кривой зависимости оптической плотности (Y) от логарифма концентрации препарата экулизумаба (X), аппроксимированной 4-параметрической логистической функцией:

$$Y = \frac{(a - d)}{1 + (x / c)^b} + d, \quad (1)$$

где a — нижняя асимптота, b — угловой коэффициент, c — точка перегиба и d — верхняя асимптота. Все расчеты выполняли в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения Microplate Manager, v. 6.0 («Bio-Rad»).

Метод биослойной интерферометрии. Метод определения концентрации экулизумаба основан на интерферометрическом измерении [3, 4] кинетики специфического взаимодействия анти-экулизумаб Fab-фрагмента, иммобилизованного на биосенсоре, с экулизумабом в исследуемом образце плазмы. Испытания выполняли с использованием интерферометра Octet® QKe System («Pall ForteBio»). Используемый анти-экулизумаб Fab-фрагмент обладает специфичностью только к экулизумабу и не связывается с другими белками в плазме крови человека. В составе анти-экулизумаб Fab-фрагмента имеется C-концевая гексагистидиновая последовательность, обеспечивающая обратимую иммобилизацию его на поверхности биосенсоров. Биосенсоры сначала инкубировали в растворе анти-экулизумаб Fab-фрагмента, контролируя уровень насыщения (рис. 1, а). После достижения насыщения биосенсоры инкубировали с модельными образцами плазмы в 10- и 20-кратном разведении, а также с растворами стандартов, содержащими антитело экулизумаб в концентрации от 0,47 до 30 мкг/мл. В ходе инкубации для каждого образца регистрировали скорость образования комплексов анти-экулизумаб Fab-фрагмент–экулизумаб» (рис. 1, б).

По результатам анализа калибровочных растворов определяли зависимость скорости образования комплексов (Y) от концентрации экулизумаба (X), выраженную линейной функцией вида:

$$Y = kX + b, \quad (2)$$

где k — угловой коэффициент, b — свободный член.

На основании калибровочной функции (рис. 2) вычисляли концентрацию экулизумаба в испытуемых образцах.

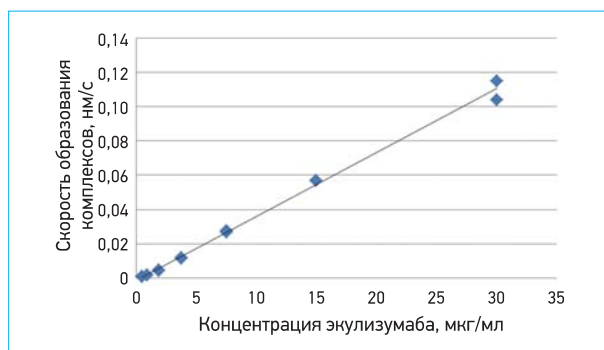


Рис. 2. Градуировочная кривая зависимости сигнала (скорости образования комплексов) от концентрации экулизумаба при использовании методики на основе биослойной интерферометрии.

Все расчеты выполняли в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения Octet® Software, v.9.0 («ForteBio»).

Результаты и обсуждение

Валидацию методики определения концентрации экулизумаба в плазме крови человека на основе биослойной интерферометрии, в том числе, установку критериев приемлемости, проводили в соответствии с требованиями нормативных документов Евразийского экономического союза и Европейского союза, относящихся к валидации биоаналитических методик испытаний [5, 6]. В ходе валидации оценивали следующие метрологические характеристики: устойчивость параметров градуировочной функции, правильность, прецизионность между попытками и внутри опыта, линейность разведений, специфичность и селективность (эффект матрицы). По результатам оценки указанных характеристик определяли аналитический диапазон методики и минимально необходимое разведение испытуемых образцов. По итогам валидации сопоставляли характеристики методики на основе биослойной интерферометрии с ранее оцененными характеристиками аналогичной методики на основе иммуноферментного анализа (ИФА).

Для оценки устойчивости параметров градуировочной функции при валидации методики по оценке концентрации экулизумаба методом биослойной интерферометрии готовили и тестировали 7 градуировочных растворов. Растворы содержали экулизумаб в диапазоне концентраций 0,47–30 мкг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе с добавлением 10 %-ной C5-деплетированной сыворотки крови человека (по 2 измерения каждого раствора, всего 14 измерений) в 6 независимых опытах (№ 1–6). В каждом опыте для градуировочной функции оценивали коэффициент детерминации (R^2 , должен быть не менее

0,98). Для каждого измерения градуировочных растворов проводили обратный расчет концентрации с использованием градуировочной функции, после чего вычисляли коэффициент восстановления (%R) как процентное отношение найденного значения концентрации экулизумаба («найденно») к истинному значению для данного раствора («введено»). Для %R нормативами по валидации заданы следующие критерии оценки: для градуировочных растворов с крайними значениями концентрации экулизумаба — 75–125 %, для остальных градуировочных растворов — 80–120 %. В каждом опыте установленные критерии должны соблюдаться, по меньшей мере, для 11 из 14 измерений. Во всех опытах получены удовлетворительные результаты, что позволяет считать параметры градуировочной функции устойчивыми (табл. 1). Градуировочная функция, полученная в опыте № 6 и обладающая наилучшими характеристиками (наибольшее значение R^2 и соответствие %R установленному критерию для 14 измерений), была использована при обработке результатов во всех последующих опытах.

Для оценки правильности методики готовили и тестировали 7 образцов экулизумаба с концентрацией от 3 до 250 мкг/мл в 100 %-ной C5-деплетированной сыворотке крови человека в 6 независимых опытах (№ 7–12). Каждый образец испытывали в разведениях 1/10 и 1/20, по 2 измерения на каждое разведение, усредняя результат по разведениям и измерениям. Для каждого образца по результатам каждого опыта вычисляли коэффициент восстановления (%R) и оценивали его соответствие установленным критериям: для образцов с крайними значениями концентрации экулизумаба — 75–125 %, для остальных — 80–120 %. Во всех опытах результаты удовлетворяют установленным критериям для %R (для образцов с крайними значениями концентрации экулизумаба — 75–125 %, для остальных — 80–120 %), что позволяет считать методику правильной (табл. 2).

Оценку прецизионности между опытами проводили в опытах № 7–12. Для каждого образца экулизумаба с концентрацией от 3 до 250 мкг/мл по результатам 6 опытов вычисляли среднее значение найденной концентрации экулизумаба, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (%CV). Во всех опытах результаты удовлетворяют установленным критериям для %CV между опытами (для образцов с крайними значениями концентрации экулизумаба — менее 25 %, для остальных — менее 20 %), что позволяет считать прецизионность между опытами приемлемой (табл. 2).

Оценку прецизионности внутри опыта проводили в опыте № 13. Готовили 7 образцов экулизумаба по той же схеме, что и в опытах № 7–12, однако каждый образец тестировали в 6 независимых повторностях — по 2 разведения на каждую повторность и по 2 измерения на каждое разведение. В каждой повторности результат усредняли

Таблица 1. Результаты оценки устойчивости параметров градуировочной функции

№ опыта	1	2	3	4	5	6
R^2 (коэффициент детерминации)	0,9936	0,9914	0,9936	0,9904	0,9933	0,9951
k (угловой коэффициент)	0,00407	0,00382	0,00446	0,00386	0,00335	0,00349
b (свободный член)	0,00236	0,00282	0,00066	0,00137	-0,00093	-0,00110
Количество измерений градуировочных растворов, для которых %R (коэффициент восстановления) удовлетворяет установленному критерию	13	14	13	13	12	14

по разведениям и измерениям. Для каждого образца вычисляли среднее по повторностям значение найденной концентрации экулизумаба, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации ($\%CV$). Результаты удовлетворяют установленным критериям для $\%CV$ между повторно-

стями (для образцов с крайними значениями концентрации экулизумаба — менее 25 %, для остальных — менее 20 %), что позволяет считать прецизионность внутри опыта приемлемой (табл. 3).

Так как методика предполагает разведение испытуемых образцов в 10 и 20 раз, проводили оценку линейности разведения в опытах № 7–12. В каждом опыте для каждо-

Таблица 2. Результаты оценки правильности и прецизионности между опытами

Введено препарата, мкг/мл	№ опыта	Найдено препарата, мкг/мл	%R (коэффициент восстановления), %	Среднее	SD	%CV, %
250	7	290,5	116,2	288,5	12,1	4,2
	8	295,0	118,0			
	9	299,6	119,8			
	10	295,6	118,2			
	11	284,1	113,6			
	12	266,2	106,5			
120	7	133,0	110,9	134,8	2,8	2,1
	8	135,4	112,8			
	9	136,7	113,9			
	10	134,7	112,2			
	11	138,3	115,3			
	12	130,5	108,7			
50	7	43,1	86,2	47,3	4,2	9,0
	8	43,7	87,5			
	9	52,1	104,3			
	10	47,1	94,3			
	11	44,8	89,6			
	12	52,8	105,5			
20	7	19,8	98,8	20,8	1,2	5,8
	8	20,4	102,0			
	9	21,4	106,9			
	10	20,9	104,6			
	11	19,7	98,5			
	12	22,9	114,6			
9	7	9,1	101,1	9,4	0,5	4,9
	8	9,1	100,6			
	9	9,7	107,8			
	10	9,4	104,9			
	11	9,2	101,9			
	12	10,3	114,1			
6	7	6,3	104,8	6,4	0,2	3,0
	8	6,4	107,3			
	9	6,3	105,5			
	10	6,5	107,6			
	11	6,2	103,8			
	12	6,8	112,7			
3	7	3,1	101,9	2,9	0,2	6,1
	8	2,9	97,8			
	9	2,8	92,2			
	10	3,0	98,5			
	11	2,6	87,7			
	12	3,1	103,3			

Таблица 3. Результаты оценки прецизионности внутри опыта

Введено препарата, мкг/мл	№ повторности	Найдено препарата, мкг/мл	Среднее	SD	%CV, %
250	1	258,7	249,9	7,6	3,0
	2	245,0			
	3	246,1			
	4	236,5			
	5	232,7			
	6	233,3			
120	1	119,3	114,5	6,1	5,3
	2	116,4			
	3	107,7			
	4	108,0			
	5	103,4			
	6	107,5			
50	1	48,3	46,1	2,8	6,0
	2	46,9			
	3	43,0			
	4	43,1			
	5	46,4			
	6	45,1			
20	1	18,8	18,0	0,8	4,6
	2	18,1			
	3	17,2			
	4	16,8			
	5	16,6			
	6	17,3			
9	1	9,7	9,25	0,53	5,7
	2	9,5			
	3	8,7			
	4	10,1			
	5	9,2			
	6	9,1			
6	1	6,9	6,60	0,26	3,9
	2	6,4			
	3	6,6			
	4	6,2			
	5	6,8			
	6	6,3			
3	1	3,3	3,08	0,16	5,3
	2	3,0			
	3	3,0			
	4	3,1			
	5	3,0			
	6	2,9			

Таблица 4. Результаты оценки линейности разведений

Введено препарата, мкг/мл	№ опыта	Найдено препарата, мкг/мл			SD	%CV, %
Разведение образца:		1/10	1/20	Среднее		
250	7	277,6	303,5	290,5	18,3	6,3
	8	279,2	310,8	295,0	22,4	7,6
	9	288,8	310,3	299,6	15,2	5,1
	10	283,2	308,0	295,6	17,6	5,9
	11	256,7	311,5	284,1	38,7	13,6
	12	228,9	303,5	266,2	52,8	19,8
120	7	128,1	138,0	133,0	7,0	5,2
	8	134,9	135,9	135,4	0,7	0,5
	9	131,3	142,1	136,7	7,6	5,6
	10	126,3	143,1	134,7	11,8	8,8
	11	134,7	142,0	138,3	5,2	3,8
	12	121,2	139,7	130,5	13,1	10,0
50	7	45,8	40,4	43,1	3,9	8,9
	8	46,8	40,7	43,7	4,3	9,9
	9	58,4	45,9	52,1	8,8	16,9
	10	52,0	42,3	47,1	6,8	14,5
	11	48,5	41,1	44,8	5,2	11,7
	12	57,7	47,8	52,8	7,0	13,3
20	7	17,4	22,1	19,8	3,3	16,8
	8	18,0	22,9	20,4	3,5	17,0
	9	20,1	22,7	21,4	1,9	8,8
	10	18,4	23,5	20,9	3,6	17,1
	11	17,8	21,7	19,7	2,8	14,0
	12	21,7	24,2	22,9	1,7	7,6
9	7	8,3	9,9	9,1	1,1	11,7
	8	8,1	10,0	9,1	1,3	14,8
	9	9,0	10,5	9,7	1,1	10,9
	10	8,6	10,3	9,4	1,2	12,2
	11	8,4	10,0	9,2	1,2	12,7
	12	9,6	10,9	10,3	0,9	8,7
6	7	6,0	6,6	6,3	0,4	6,6
	8	5,7	7,2	6,4	1,0	15,7
	9	6,0	6,7	6,3	0,5	7,7
	10	5,9	7,1	6,5	0,8	13,0
	11	5,8	6,7	6,2	0,6	9,7
	12	6,4	7,1	6,8	0,5	7,1
3	7	2,6	3,5	3,1	0,6	19,5
	8	2,6	3,3	2,9	0,5	18,6
	9	2,5	3,0	2,8	0,4	13,6
	10	2,6	3,3	3,0	0,5	16,0
	11	2,3	3,0	2,6	0,5	19,4
	12	2,7	3,5	3,1	0,6	18,4

го разведения отдельно определяли найденную концентрацию с учетом кратности разведения, усредненную по двум измерениям. Для каждого образца вычисляли среднее по двум разведениям значение найденной концентрации экулизумаба, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (%CV). Результаты удовлетворяют установленным критериям для %CV между разведениями (для образцов с крайними значениями концентрации экулизумаба — менее 25 %, для остальных — менее 20 %), что позволяет считать линейность разведения приемлемой (табл. 4).

Специфичность методики как способность используемых реактивов связываться исключительно с анализируемым веществом, оценивали в опыте № 14 по двум различным аспектам:

а) отсутствие значимого фоновых сигнала в образцах, не содержащих экулизумаб, но содержащих все остальные компоненты матрицы. Для этого тестировали индивидуальные образцы плазмы крови, взятые у 10 здоровых доноров, и во всех случаях получали нулевое значение концентрации экулизумаба (табл. 6);

б) отсутствие значимого сигнала в образцах, содержащих вещество, структурно родственное экулизумабу. Для этого готовили и испытывали образцы 100 %-ной С5-деплетированной сыворотке крови человека с добавлением препарата Пролиа® в концентрации от 3 до 250 мкг/мл. В качестве действующего вещества этот препарат содержит полностью человеческое моноклональное антитело деносуаба, в наибольшей степени среди доступных препаратов схожее с экулизумабом по структуре, но отличающееся по специфическим участкам аминокислотной последовательности. Деносуаба относится к изотипу IgG2, в то время как экулизумаб содержит участки аминокислотной последовательности, характерные для изотипов IgG2 и IgG4. В результате анализа во всех образцах, вне зависимости от концентрации деносуаба, получили нулевое значение концентрации экулизумаба (данные не приведены).

Результаты, полученные в опыте № 14 (отсутствие значимого сигнала в образцах, не содержащих экулизумаб, но содержащих все остальные компоненты матрицы, а также в образцах, содержащих вещество, структурно родственное экулизумабу), в совокупности свидетельствуют о специфичности валидируемой методики.

Селективность методики как способность определять анализируемое вещество в присутствии неродственных соединений в биологическом образце, т.е. естественных компонентов биологической матрицы, оценивали в опыте № 15. Готовили и испытывали индивидуальные образцы плазмы крови, взятые у 10 здоровых доноров, к каждому из которых добавляли экулизумаб до концентрации

Таблица 5. Сравнение основных метрологических характеристик методов определения концентрации экулизумаба в плазме крови человека на основе иммуноферментного анализа (ИФА) и биослойной интерферометрии

Характеристика	Оцениваемый показатель	Метод ИФА	Метод биослойной интерферометрии
Правильность	%R (коэффициент восстановления), %	78,7–104,8	86,2–119,8
Прецизионность между опытами	%CV (коэффициент вариации), %	3,1–27,1	2,1–9,0
Прецизионность внутри опыта	%CV (коэффициент вариации), %	2,8–12,7	3,0–6,0
Селективность (эффект матрицы)	%CV (коэффициент вариации), %	13,6–22,2	3,5–6,0
Аналитический диапазон	Концентрация, мкг/мл	20–250	3–250
Минимально необходимое разведение образцов	Кратность разбавления, раз	1/1000	1/10

Таблица 6. Результаты оценки специфичности и селективности (эффекта матрицы)

Введено препарата, мкг/мл	0	120	250
Номер донора	Найдено препарата, мкг/мл		
01	0	126,0	214,3
02	0	126,0	255,8
03	0	126,0	226,8
04	0	129,4	236,8
05	0	130,4	232,8
06	0	126,6	237,7
07	0	120,3	244,0
08	0	117,1	208,1
09	0	130,1	238,0
10	0	121,5	238,7
Среднее	—	125,3	233,3
SD	—	4,4	13,9
%CV, %	—	3,5	6,0

120 или 250 мкг/мл. Для каждого уровня концентрации внесенного экулизумаба вычисляли среднее найденное значение по образцам, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (%CV). Значение %CV рассматривали как показатель эффекта матрицы. Полученные результаты удовлетворяют установленным критериям (%CV менее 20 % между образцами с одинаковым уровнем концентрации внесенного экулизумаба), что позволяет считать методику селективной, а эффект матрицы — приемлемым (табл. 5).

Выводы

Проведенная валидация методики, основанной на биослойной интерферометрии, включающая оценку требуемых метрологических характеристик (правильности, прецизионности между опытами и внутри опыта, линейности разведений, специфичности и селективности) подтверждает возможность ее применения для достоверного определения концентрации экулизумаба в образцах плазмы крови человека в диапазоне 3–250 мкг/мл. В таблице 6 приведены сравнительные данные по основным метрологическим характеристикам методики на основе биослойной интерферометрии и альтернативной методики на основе иммуноферментного анализа, для которой ранее была выполнена валидация.

Об авторах

Общество с ограниченной ответственностью «Международный биотехнологический центр «Генериум», 601125, Российская Федерация, Владимирская область, пос. Вольгинский, ул. Владимирская, 14.

Симонов Владимир Михайлович. Научный сотрудник отдела молекулярной и клеточной биологии.

Пантюшенко Мария Семеновна. Научный сотрудник отдела аналитических методов.

Казаров Александр Александрович. Начальник лаборатории иммунохимии отдела аналитических методов.

Порошин Григорий Николаевич. Научный сотрудник отдела аналитических методов.

Акционерное общество «Генериум». 123317, Российская Федерация, Москва, ул. Тестовская, д. 10, оф. 214.

Маркова Оксана Анатольевна. Руководитель научной клинической группы управления клинических исследований.

Адрес для переписки: Порошин Григорий Николаевич; poroshin@ibcgenerium.ru

Основными преимуществами методики на основе биослойной интерферометрии являются более широкий аналитический диапазон (нижний предел количественного определения составляет 3 мкг/мл против 20 мкг/мл для альтернативной методики), лучшая правильность, прецизионность и селективность. При использовании биослойной интерферометрии минимально необходимое разведение образцов — 1/10 (для альтернативной методики — 1/1000), что существенно упрощает процедуру и минимизирует погрешность получаемых результатов, хотя и несколько увеличивает количество биоматериала, требуемое для анализа. Наконец, методика на основе биослойной интерферометрии обеспечивает заметно более высокую производительность, что позволяет выполнить анализ образцов за меньшее время. Так, анализ 20 образцов в одном опыте (включая обработку полученных результатов) при использовании методики на основе биослойной интерферометрии занимает 1,5–2 ч, при использовании методики на основе иммуноферментного анализа — 6–8 часов. Среди недостатков биослойной интерферометрии — относительно высокая стоимость оборудования и достаточно строгие требования к квалификации исполнителей анализа. Тем не менее, очевидно, что методики на основе этой технологии могут найти применение в доклинических и клинических исследованиях биотерапевтических лекарственных препаратов.

Литература

1. Young N, Maciejewski J. Genetic and environmental effects in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: this little PIG-A goes «Why? Why? Why?». *J Clin Investigation* 2000, 106: 637–41.
2. Al-Ani F, Chin-Yee I, Lazo-Langner A. Eculizumab in the management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: patient selection and special considerations. *Therapeutics Clinical Risk Management* 2016, 12: 1161–70.
3. Abdiche Y, Malashock D, Pinkerton A, Pons J. Determining kinetics and affinities of protein interactions using a parallel real-time label-free biosensor, the Octet. *Anal Biochem*. 2008, 377: 209–17.
4. Do T, Ho F, Heidecker B, Witte K, Chang L, Lerner L. A rapid method for determining dynamic binding capacity of resins for the purification of proteins. *Protein Expression Purification* 2008, 60: 147–50.
5. Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. Утверждены Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 / Приложение № 6. Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов.
6. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011.

Development and validation of a method for determination of Eculizumab concentration in human plasma by biolayer interferometry

V. M. Simonov¹, M. S. Pantushenko¹, A. A. Kazarov¹, O. A. Markova², G. N. Poroshin¹

¹ Limited Liability Company «International Biotechnology Center «Generium», Vladimirskaia street 14, Volginsky 601125, Vladimir region, Russian Federation

² Joint-stock company «Generium», Testovskaya street 10, office 214, Moscow 123317, Russian Federation

The article describes a new method for measurement of monoclonal antibody Eculizumab concentration in human plasma in a range of 3–250 µg/mL. In this method we used an antibody Fab fragment, capable of binding to eculizumab specifically in human plasma. The method uses the biolayer interferometry for determination of Eculizumab concentration without additional tag in the analyzing substances. This method was comparatively validated along with the traditional ELISA. Comparative validation demonstrated that the biolayer interferometry based method has an advantage to the ELISA in such important statistical criteria as an analytical range, accuracy, precision, specificity and selectivity (matrix effect).

Key words: monoclonal antibody; Eculizumab; biolayer interferometry; validation.

For citation: Simonov VM, Pantushenko MS, Kazarov AA, Markova OA, Poroshin GN. Development and validation of a method for determination of Eculizumab concentration in human plasma by biolayer interferometry. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(3): 158–164.

References

1. Young N, Maciejewski J. Genetic and environmental effects in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: this little PIG-A goes «Why? Why?». *J Clin Investigation* 2000, 106: 637–41.
2. Al-Ani F, Chin-Yee I, Lazo-Langner A. Eculizumab in the management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: patient selection and special considerations. *Therapeutics Clinical Risk Management* 2016, 12: 1161–70.
3. Abdiche Y, Malashock D, Pinkerton A, Pons J. Determining kinetics and affinities of protein interactions using a parallel real-time label-free biosensor, the Octet. *Anal Biochem.* 2008, 377: 209–17.
4. Do T, Ho F, Heidecker B, Witte K, Chang L, Lerner L. A rapid method for determining dynamic binding capacity of resins for the purification of proteins. *Protein Expression Purification* 2008, 60: 147–50.
5. Rules for conducting bioequivalence studies of medicinal products within the framework of the Eurasian Economic Union. Approved by the Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission of November 3, 2016.
6. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011.

Authors

Limited Liability Company «International Biotechnology Center «Generium», Vladimirskaia street 14, Volginsky 601125, Vladimir region, Russian Federation. Simonov V. M. Staff scientist of molecular and cellular biology department.

Pantushenko M. S. Staff scientist of department of analytical methods.

Kazarov A. A. Head of immunochemistry laboratory of department of analytical methods.

Poroshin G. N. Staff scientist of department of analytical methods.

Joint-stock company «Generium», Testovskaya street 10, office 214, Moscow 123317, Russian Federation.

Markova O. A. Head of scientific clinical group of clinical study department.

Contact e-mail: Poroshin Grigory Nikolaevich; poroshin@ibcgenerium.ru

Оптимизация способов математической обработки калибровочных кривых при оценке молекулярной массы биологических лекарственных средств методом электрофореза в полиакриламидном геле с SDS

В. А. Томилин, Н. Л. Иванютина, Е. В. Эльберт, Р. А. Волкова

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 30.06.2017 г. Принята к публикации 04.07.2017 г.

При испытании биологических лекарственных средств по показателям «Подлинность», «Чистота», «Молекулярная масса» проводят сравнительную оценку исследуемого и стандартного образцов различными физико-химическими методами, в том числе методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (SDS) в восстанавливающих/невосстанавливающих условиях. Для оценки молекулярной массы компонентов стандартного и исследуемого образцов необходимо построение калибровочного графика с использованием белков-маркеров. Проведено 4 эксперимента по электрофоретическому разделению на одном геле наиболее часто используемых наборов маркеров молекулярных масс различных производителей (Amersham™ LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (Am), SDS PAGE Molecular Weight Standards, low range (BR), Unstained Protein Molecular Weight Marker (Th), BenchMark™ Protein Ladder (BM), Mark12™ Unstained Standard (M12) (общее количество белков — 45). Работа выполнена с целью оптимизации способов математической обработки калибровочных кривых для указанных наборов и оценки возможности их взаимозаменяемости. Электрофорез в ПААГ с SDS проводили в восстанавливающих условиях с использованием трис-глициновых заливных гелей. Для сравнения рассчитываемых (M) и номинальных (M_0) (указанных в инструкции по применению набора маркеров) значений молекулярной массы (ММ) белков-маркеров нами использовано отклонение ММ в пересчете на единицу молекулярной массы (далее — относительное отклонение). Оценка среднего относительного отклонения молекулярной массы маркеров наборов диапазона ММ 10–100 кДа (наборы Am, BR, Th) при использовании уравнений линейной регрессии показала значения около 10 % (от 8,3 до 12,0 %). Для наборов расширенного диапазона ММ 10–220 кДа (наборы BM, M12) среднее относительное отклонение (16,5–20,3 %) было практически вдвое больше. С целью оптимизации математической обработки для расчета калибровочной зависимости мы применили полиномиальное уравнение регрессии третьей степени. Это позволило снизить относительное отклонение ММ до 2,3–3,5 % при использовании наборов диапазона 10–100 кДа и до 3,7–4,0 % при использовании наборов расширенного диапазона, что важно при оценке сопоставимости различных продуктов.

Ключевые слова: электрофорез в полиакриламидном геле с SDS; молекулярная масса; калибровочный график; линейная регрессия; полином.

Библиографическое описание: Томилин ВА, Иванютина НЛ, Эльберт ЕВ, Волкова РА. Оптимизация способов математической обработки калибровочных кривых при оценке молекулярной массы биологических лекарственных средств методом электрофореза в полиакриламидном геле с SDS. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(3): 165–172.

При испытании биотехнологических лекарственных средств по показателям «Подлинность», «Чистота», «Молекулярная масса» проводят сравнительную оценку испытуемого и стандартного образцов различными физико-химическими методами, в том числе методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (SDS) в восстанавливающих/невосстанавливающих условиях, который включен в ГФ XIII (ОФС.1.2.1.0023.15) [1]. ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле» допускает выбор условий электрофореза и используемые реагенты в зависимости от решаемых задач без определения критерия для их выбора. Допускается использование гелей различного состава, различных белков-маркеров молекулярных масс (ММ), буферных и окрашивающих растворов, возможны варианты обработки образцов и другие различия.

Анализ нормативных документов на различные лекарственные препараты показал, что метод электрофоре-

за в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия широко используется для контроля качества биотехнологических препаратов. Часть препаратов ранее контролировалась по унифицированной методике [2]. Однако в настоящее время в НД на лекарственные средства приведены конкретные методики, в которых различаются используемые гели (заливные и коммерческие, разного размера и концентрации, в том числе градиентные гели), концентрация и состав буферных и окрашивающих растворов, допускается использование различных наборов маркеров молекулярных масс и др.

Оценка молекулярной массы полипептидов с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия основана на том, что миграция белков в присутствии избытка анионного детергента (SDS) зависит, главным образом, от их молекулярной массы [3–5]. Ошибка определения ММ в диапазоне от 12 до 220 кДа, рассчитанная по данным K. Weber и M. Osborn

достигала 10 % [4]. Близкие значения ошибки были получены и в исследовательском центре компании Invitrogen [6] при испытании коммерческих гелей (Novex®/NuPAGE® Bis-Tris, Tris-Glycine и другие) при условии учета всех результатов.

Для оценки молекулярной массы в настоящее время различными производителями выпускается широкий спектр готовых смесей белков-маркеров в разных диапазонах молекулярных масс. Анализ нормативной документации (НД) на биотехнологические лекарственные средства показал, что используются наборы маркеров различных производителей, при этом допускается использование аналогичных наборов без указания критериев признания аналогичности.

Наш опыт применения различных наборов маркеров при проведении электрофореза в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России при контроле качества биотехнологических лекарственных средств и при аттестации стандартных образцов соответствующих препаратов показал, что на заливных и готовых коммерческих гелях для маркеров как широкого, так и узкого диапазона ММ коэффициент детерминации линейной зависимости не всегда удовлетворяет требованию $R^2 \geq 0,98$.

Цель настоящей работы — оптимизация математической обработки с целью оценки взаимозаменяемости наиболее широко используемых наборов маркеров молекулярной массы для стандартизации процедуры учета результатов при использовании методики электрофореза в ПААГ с SDS. Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие задачи:

- оценить возможность оптимизации способов математической обработки получаемых данных;
- провести сравнительную оценку результатов определения ММ белков-маркеров наборов, получивших наиболее широкое распространение.

Материалы и методы

В работе использована система для вертикального электрофореза PROTEAN II xi Cell (16 × 20 см) («BioRad», США) в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия

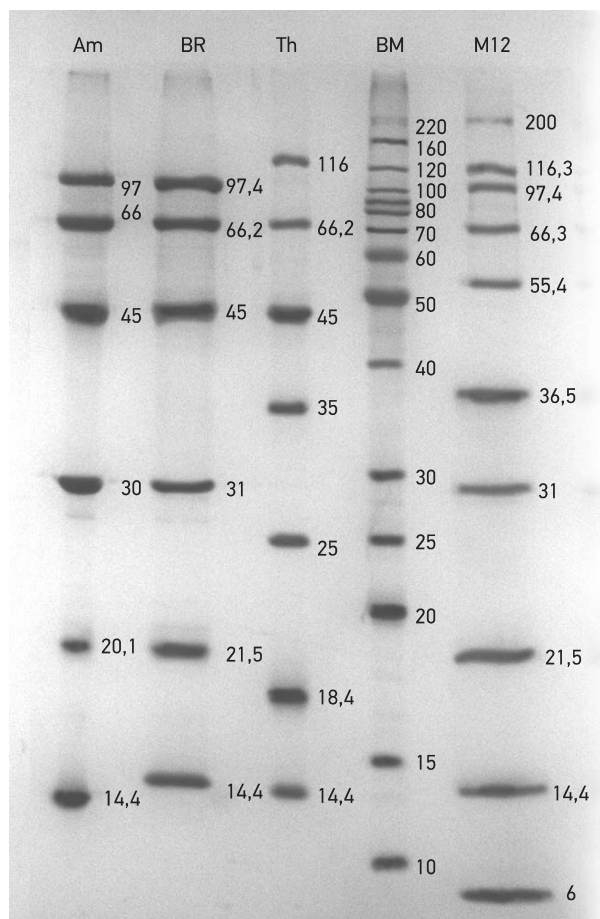


Рис. 1. Электрофореграмма № 1. 12 % Трис-глициновый заливной гель. Образцы наборов Am, Br, Th, BM, M12 были подготовлены и нанесены на гель в соответствии с рекомендацией производителей с пропуском лунок. В свободные лунки вносили буферный раствор для проб. Приведены номинальные значения ММ белков-маркеров (в кДа).

(SDS) в восстанавливающих условиях (в присутствии β-меркаптоэтанола). Приготовление 12 %-ного трис-гли-

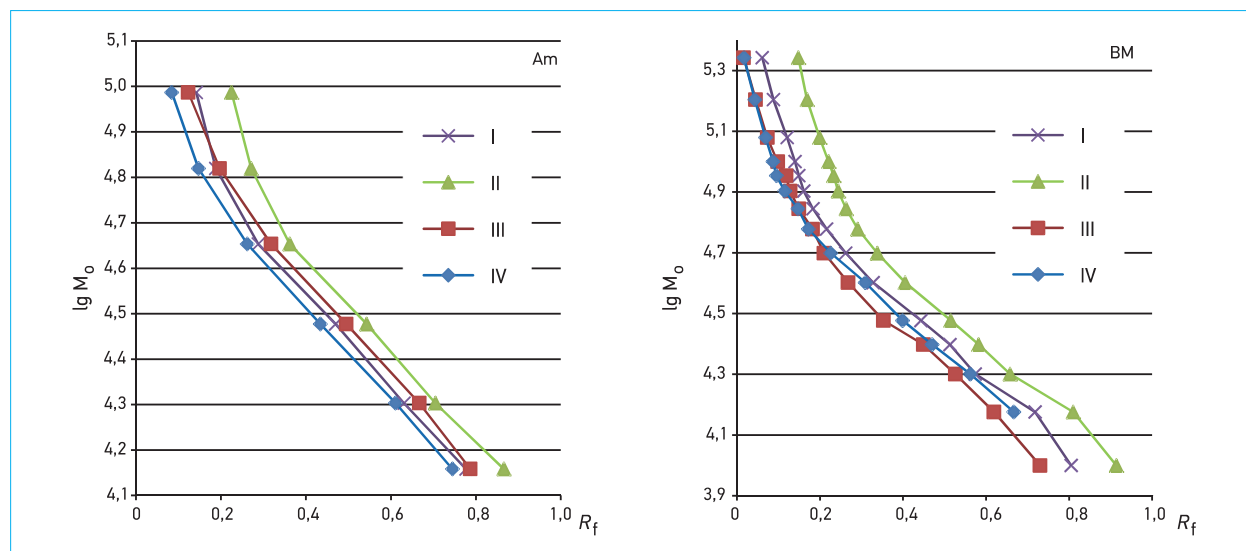


Рис. 2. Калибровочные кривые, построенные по маркерам наборов узкого (Am) и широкого (BM) диапазонов молекулярных масс в четырех испытаниях.

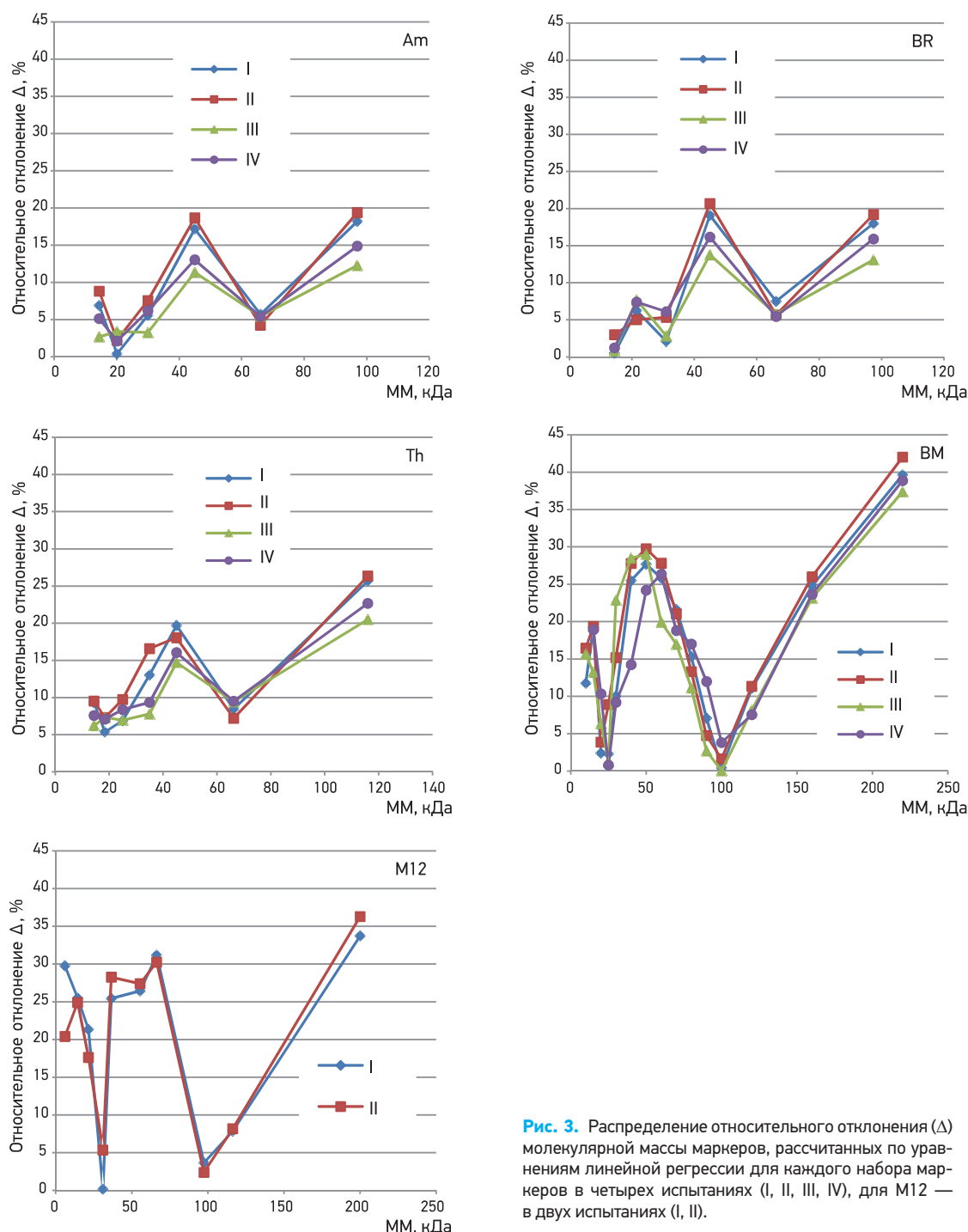


Рис. 3. Распределение относительного отклонения (Δ) молекулярной массы маркеров, рассчитанных по уравнениям линейной регрессии для каждого набора маркеров в четырех испытаниях (I, II, III, IV), для M12 — в двух испытаниях (I, II).

цинового полиакриламидного геля, электрофорез и визуализацию маркеров красителем Кумасси R-250 осуществляли по ОФС.1.2.1.0023.15. [1].

В качестве источников белков с известной молекулярной массой использованы наборы маркеров молекулярной массы Amersham™ LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis («GE Healthcare», (Am), маркеры 14,4; 20,1; 30; 45; 66 и 97 кДа), SDS PAGE Molecular Weight Standards, low range («BioRad», (BR), маркеры 14,4; 21,5; 31; 45; 66,2 и 97,4 кДа), Unstained Protein Molecular Weight Marker («Thermo», (Th), маркеры 14,4; 18,4; 25; 35; 45; 66,2 и

116 кДа), BenchMark™ Protein Ladder («Novex», (BM)*, маркеры 10; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 120; 160 и 220 кДа) Mark12™ Unstained Standard («Novex», (M12)*, маркеры 6; 14,4; 21,5; 31; 36,5; 55,4; 66,3; 97,4; 116,3 и 200 кДа). Подготовка образцов проведена в соответствии с рекомендациями производителей наборов маркеров.

* Наборы маркеров расширенного диапазона (BM и M12) предназначены для работы с готовыми коммерческими гелями, в связи с чем значения относительного отклонения для этих наборов представлены с информационной целью.

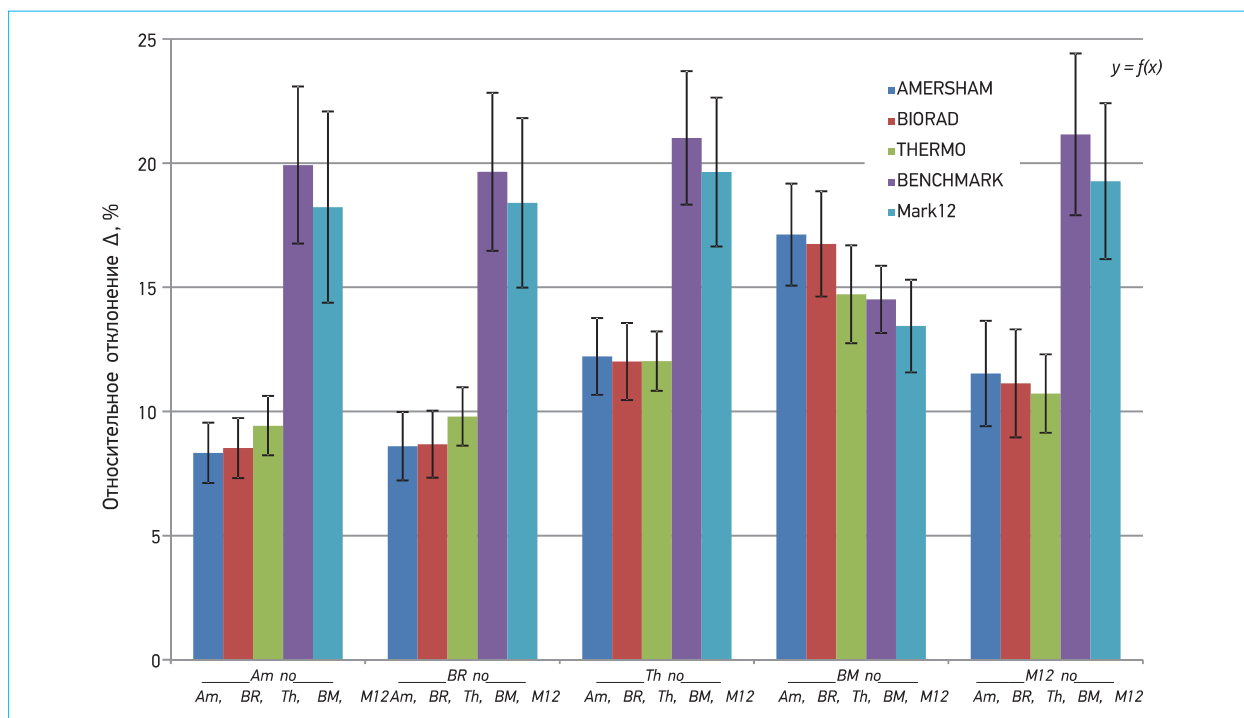


Рис. 4. Сравнение средних значений (по четырем испытаниям, M12 — по двум) относительного отклонения ММ (с обозначением ошибки среднего) наборов маркеров, рассчитанных по линейным уравнениям зависимости наборов Am, Br, Th, BM и M12.

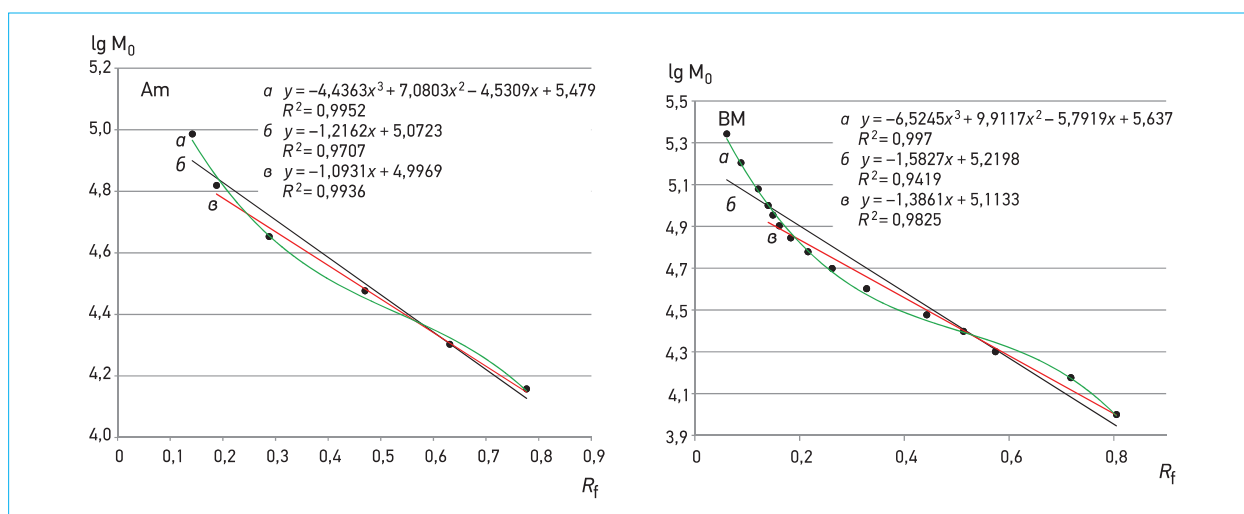


Рис. 5. Аппроксимация линии регрессии с использованием полиномиальной (а) и линейной (б) зависимостей для всех маркеров набора и для маркеров визуально линейного участка наборов узкого (Am) и широкого (BM) диапазонов ММ (а).

Сканирование, первичная обработка гелей и определение относительной подвижности белков R_f (отношение расстояния, пройденного маркером, к расстоянию, пройденному индикатором фронта) проводили в полуавтоматическом режиме в программе Quantity One системы VersaDoc. Построение калибровочных графиков осуществляли в системе координат $(\lg M_0/R_f)$, аппроксимация зависимости, расчеты и статистическая обработка результатов реализовывались с использованием пакета Microsoft Office Excel. Для сравнения рассчитываемых (M) и номинальных (M_0) (указанных в инструкции по применению набора маркеров) значений молекулярной массы белков-маркеров нами использовано абсолютное значение величины отклонения ММ в пересчете на единицу молеку-

лярной массы (далее — относительное отклонение) Δ , который находили по формуле:

$$\Delta(\%) = \frac{|M_0 - M|}{M_0} \cdot 100, \quad (1)$$

Схема эксперимента — проводили электрофоретическое разделение на одном геле всех указанных наборов маркеров (общее количество белков — 45). Эксперимент проводили 4 раза. По значению подвижности белков (R_f) рассчитывали уравнение калибровочной зависимости для каждого набора маркеров. Кажущуюся молекулярную массу (M) и ее относительное отклонение от номинального значения (M_0) рассчитывали для каждого белка по всем

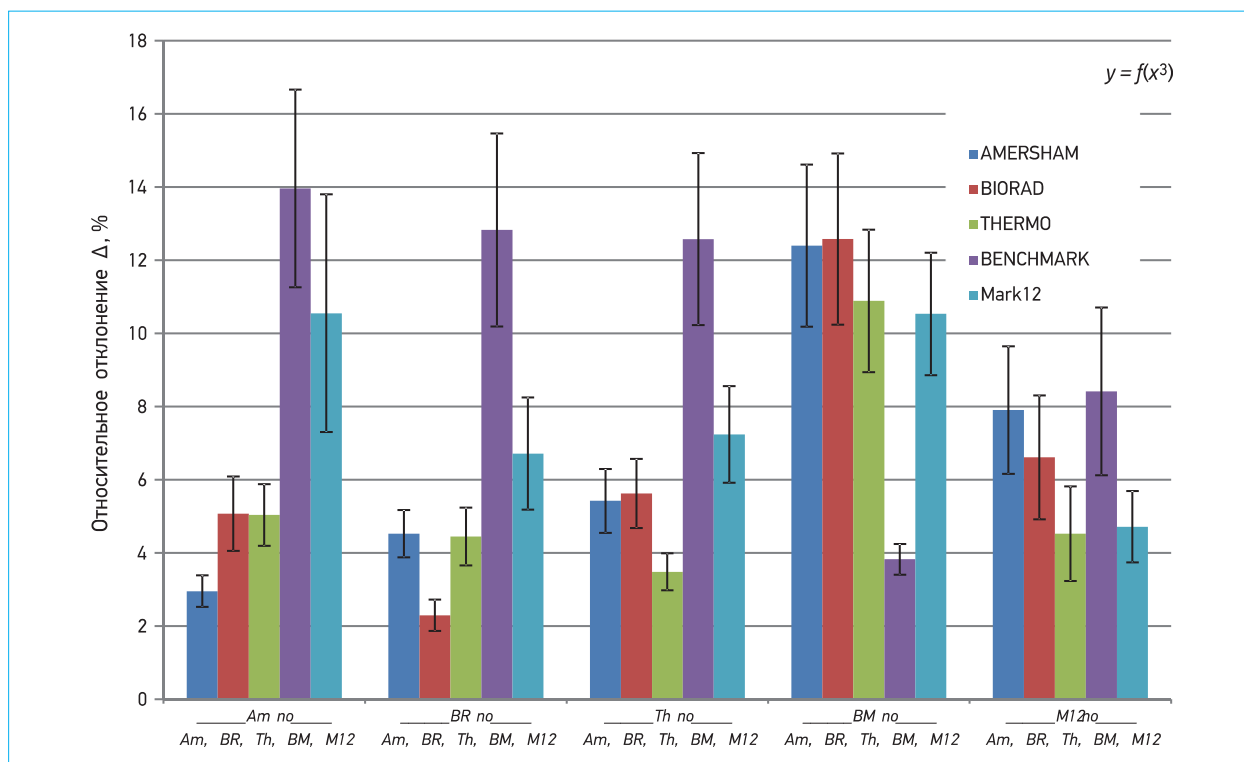


Рис. 6. Сравнение средних значений (по четырем испытаниям) относительного отклонения ММ (с обозначением ошибки среднего) наборов маркеров, рассчитанных по полиномиальным ($y=f(x^3)$) уравнениям зависимости для наборов Am, Br, Th, BM и двум испытаниям набора M12.

калибровкам. Среднее относительное отклонение молекулярной массы маркеров учитывали как для белков конкретного набора, так и для всех белков с номинальной молекулярной массой от 10 до 100 кДа.

Результаты и обсуждение

Наши эксперименты с одновременным разделением пяти наборов маркеров MW диапазонов 10–100 кДа и 10–220 кДа в присутствии SDS в восстанавливающих условиях с использованием трис-глициновых заливных гелей (рис. 1) показали различия в расстоянии миграции белков-компонентов разных наборов с равной/близкой молекулярной массой, например, для полосы, соответствующей молекулярной массе 14,4 кДа.

Калибровочные графики в системе координат ($\lg M_0/R_f$) и линейная аппроксимация калибровочной зависимости каждого из наборов маркеров во всех 4 испытаниях демонстрируют S-образный характер расположения точек калибровочного ряда, менее выраженный для наборов диапазона 10–100 кДа и более явный для расширенного диапазона (рис. 2). Характер распределения значений относительного отклонения ММ, рассчитанных по уравнениям линейной регрессии, в возрастающем ряду молекулярной массы маркеров сохранялся во всех испытаниях для всех наборов (рис. 3).

Расчет среднего относительного отклонения значений молекулярной массы маркеров наборов по всем калибровкам (рис. 4) показал, что оно близко к 10 % для наборов диапазона 10–100 кДа и вдвое больше для наборов расширенного диапазона.

Для снижения ошибки при определении молекулярной массы М. Sadeghi с соавт. [6] было предложено два

подхода: первый — использование только визуально линейных участков калибровок, второй — использование полиномиального уравнения регрессии третьей степени. Графическое сравнение применения этих подходов представлено на рисунке 5. Следует отметить, что для визуально линейных участков статистически оправданное исключение маркера из выборки (значение относительного отклонения более 3σ) возможно лишь для маркера с ММ 220 кДа набора BM.

Возможность аппроксимации калибровочного графика нелинейной функцией предусмотрена также в ГФ XIII (ОФС.1.1.0012.15) [7]. При аппроксимации используют метод наименьших квадратов, суть которого заключается в нахождении коэффициентов, обеспечивающих для исходного уравнения:

$$y_i = a_k x^k + a_{(k-1)} x^{(k-1)} + \dots + a_0, \quad (2)$$

наименьшее значение функции:

$$F(a_k, a_{k-1}, \dots, a_0) = \sum_{i=0}^k (y_i - y)^2. \quad (3)$$

Поиск значений коэффициентов осуществляется путем решения системы из $n = (k + 1)$ уравнений:

$$\begin{cases} \frac{\partial F(a_k)}{\partial a_k} = 0 \\ \frac{\partial F(a_{k-1})}{\partial a_{k-1}} = 0 \dots \\ \frac{\partial F(a_0)}{\partial a_0} = 0 \end{cases} \quad (4)$$

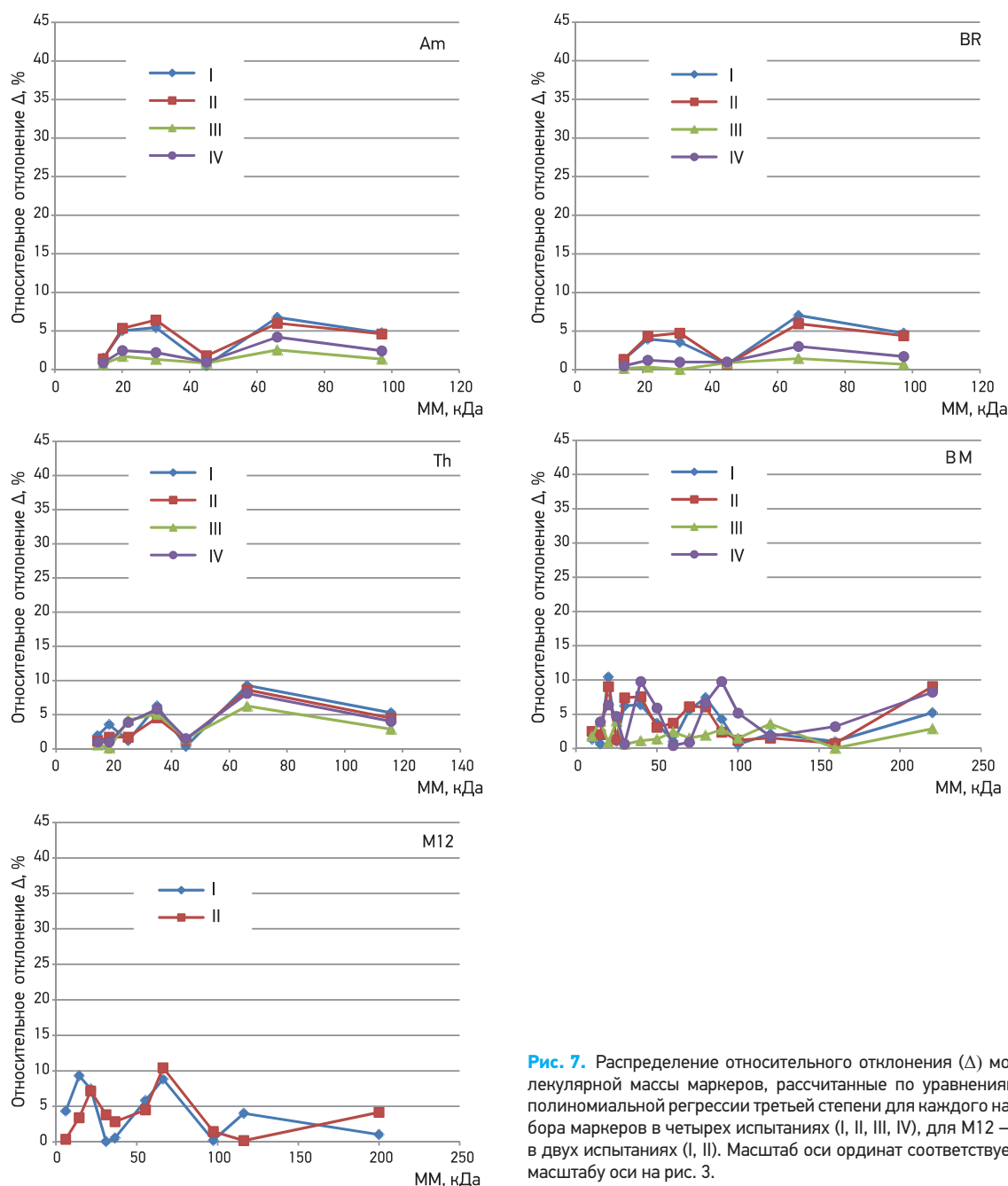


Рис. 7. Распределение относительного отклонения (Δ) молекулярной массы маркеров, рассчитанные по уравнениям полиномиальной регрессии третьей степени для каждого набора маркеров в четырех испытаниях (I, II, III, IV), для M12 — в двух испытаниях (I, II). Масштаб оси ординат соответствует масштабу оси на рис. 3.

Пакет MS Excel предоставляет возможность решения такого рода уравнений при $k \leq 6$, позволяя рассчитывать коэффициенты уравнения и показатель R^2 , характеризующий достоверность аппроксимации:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_i (M_i - M_{0i})^2}{\sum_i (M_{0i})^2 - \frac{1}{n} \cdot \left(\sum_i M_{0i} \right)^2}. \quad (5)$$

Оценка результатов применения уравнений калибровочной зависимости на основе полинома третьей степени показала, что минимальные средние значения относительного отклонения MM маркеров наборов наблюдаются

в случае использования уравнения зависимости, рассчитанного по маркерам этого же ряда (рис. 6).

Использование полиномиального уравнения регрессии третьей степени позволило снизить среднее относительное отклонение молекулярной массы маркеров наборов Am, BR и Th (диапазон 10–100 кДа) с 8,3–12,0 % до 2,3–3,5 %, а для расширенного диапазона (наборы BM и M12) с 16,5–20,3 % до 3,7–4,0 % (рис. 6, табл. 1).

Уменьшение относительного отклонения (Δ) молекулярной массы маркеров, рассчитанное по уравнению полиномиальной регрессии для каждого набора маркеров в четырех испытаниях, представлено на рисунке 7.

Таким образом, применение полиномиального уравнения регрессии третьей степени, благодаря уменьшению

Таблица 1. Среднее значение относительного отклонения молекулярной массы белков-маркеров наборов узкого (Am, BR, Th) и широкого (BM и M12) диапазонов ММ при использовании линейной ($y = f(x)$) и полиномиальной регрессии ($y = f(x^3)$)

Набор маркеров	Среднее относительное отклонение от номинальной массы маркеров (Δ), %			
	$y = f(x)$		$y = f(x^3)$	
	$M \pm m$	n	$M \pm m$	n
Am	8,3 $\pm$ 1,2	24	3,0 $\pm$ 0,4	24
BR	8,7 $\pm$ 1,4	24	2,3 $\pm$ 0,4	24
Th	12,0 $\pm$ 0,6	28	3,5 $\pm$ 0,2	28
BM	16,5 $\pm$ 1,4	59	3,7 $\pm$ 0,4	59
M12	20,3 $\pm$ 2,6	20	4,0 $\pm$ 0,8	20

относительного отклонения, позволяет повысить точность определения молекулярной массы белков, что особенно важно при оценке сопоставимости различных продуктов [8, 9], а также позволяет допустить возможность использования наборов маркеров расширенного диапазона с заливными гелями после валидации методики с учетом вышеизложенного. Замена наборов маркеров ММ, рекомендованных нормативной документацией, на аналогичные требует разработки критериев для признания аналогичности, которые должны учитывать условия проведения испытания и требования к точности результатов анализа.

ВЫВОДЫ

1. Применение полинома третьей степени при аппроксимации калибровочной зависимости снижает относительное отклонение при определении молекулярной массы белков до 4 %: с 8,3–12,5 % до 2,2–3,5 % для диапазона 10–100 кДа, с 16,5–20,3 % до 3,7–4,0 % для расширенного диапазона молекулярной массы 10–220 кДа, что обеспечивает большую точность при сравнении результатов определения молекулярной массы белков, что особенно важно при оценке сопоставимости различных продуктов.

2. Применение полинома третьей степени при аппроксимации калибровочной зависимости допускает возможность использования наборов маркеров BM и M12 с заливными гелями.

3. Замена наборов маркеров ММ, рекомендованных нормативной документацией, на аналогичные должна производиться с учетом условий проведения испытания и требований к точности анализа.

Литература

- ОФС. 1.2.1.0023.15. Электрофорез в полиакриламидном геле. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. М.; 2015. С. 638–57. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
- Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая. М.: Гриф и К; 2013. С. 80–4.
- Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*. 1967; 28(5): 815–20.
- Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*. 1969; 244(16): 4406–12.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680–5.
- Sadeghi M, Hajivandi M, Bogoev R, Amshey J. Molecular weight estimation of proteins by gel electrophoresis revisited. *Focus* 2003; 25: 35–39.
- ОФС. 1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. М.; 2015. С. 222–34. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
- Азеева ЖИ, Волкова РА, Алпатова НА, Солдатов АА, Медуницын НВ, Меркулов ВА. Методические приемы и принципы оценки сопоставимости биотехнологических продуктов, полученных до и после внесения изменений в процесс производства. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2013; (2): 18–21.
- Бондарев ВП, Борисевич ИВ, Волкова РА, Фадейкина ОВ. Проблемы аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2013; (2): 28–32.

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.

Томили́н Влади́мир Андре́евич. Эксперт 1-ой категории лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Иваню́тина Ната́лья Леони́довна. Эксперт 2-ой категории лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Эльбе́рт Елиза́вета Викто́ровна. Главный эксперт лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Волко́ва Ра́уза Асха́товна. Начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р биол. наук.

Адрес для переписки: Томили́н Влади́мир Андре́евич; tomilin@expmed.ru
Волко́ва Ра́уза Асха́товна; volkova@expmed.ru

Optimization of mathematical processing of calibration curves when determining molecular mass of biologicals by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

V. A. Tomilin, N. L. Ivanyutina, E. V. Elbert, R. A. Volkova

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

Identification and purity testing of biologicals as well as determination of their molecular mass are performed on the basis of comparison of test and reference samples by various physico-chemical methods, including Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing or non-reducing conditions. In order to assess the molecular weight of the test sample and reference sample components a calibration curve is drawn using protein markers. The article describes 4 experiments in which gel electrophoresis was used for separation of the most widely used sets of molecular weight markers produced by various manufacturers (Amersham™ LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (Am), SDS PAGE Molecular Weight Standards, low range (BR), Unstained Protein Molecular Weight Marker (Th), Bench-Mark™ Protein Ladder (BM), Mark12™ Unstained Standard (M12) (total number of proteins — 45)). The aim of the study was to optimize mathematical processing of calibration curves generated for the above-mentioned sets of markers and to assess their interchangeability. SDS PAGE was performed under reducing conditions using Tris-Glycine gels. The real calculated (M) and nominal (M_0) values (indicated in the set of markers instructions for use) of the protein markers molecular mass (MM) were compared using the MM deviation expressed in terms of a molecular mass unit (hereinafter — relative deviation). The estimated average MM relative deviation for sets of markers ranging from 10 to 100 kDa (Am, BR, Th sets), which was calculated using linear regression equations, was equal to about 10 % (8.3 – 12.0 %). In the case of the extended MM range of 10 – 220 kDa (BM, M12 sets) the average relative deviation was almost twice as high (16.5 – 20.3 %). A third-order polynomial regression equation was used to optimize mathematical processing methods used during calculation of the calibration function. This made it possible to reduce the MM relative deviation down to 2.3 – 3.5 % when using sets ranging from 10 to 100 kDa, and to 3.7 – 4.0 % when using the extended range sets, which is important for assessing similarity of different products.

Key words: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; molecular mass; calibration curve; linear regression; polynomial.

For citation: Tomilin VA, Ivanyutina NL, Elbert EV, Volkova RA. Problems of standardization of the account of results in assessing the quality of biotechnological drugs by electrophoresis in page with SDS. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(3): 165–172.

References

1. OFS. 1.2.1.0023.15. Polyacrylamide gel electrophoresis. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 1. P. 638–57. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
2. Mironov AN, ed. Guidelines for preclinical studies of medicines (immunobiological medicines). Part 2. Moscow: Grif i K; 2013. P. 80–4 (in Russian).
3. Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*. 1967; 28(5): 815–20.
4. Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*. 1969; 244(16): 4406–12.
5. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680–5.
6. Sadeghi M, Hajivandi M, Bogoev R, Amshey J. Molecular weight estimation of proteins by gel electrophoresis revisited. *Focus* 2003; 25: 35–39.
7. OFS. 1.1.0012.15. Analytical methods validation. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 1. P. 222–34. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
8. Avdeeva JI, Volkova RA, Alpatova NA, Soldatov AA, Medunitsyn NV, Merkulov VA. Methodology and principles for comparability assessment of biopharmaceuticals obtained before and after modifications in the manufacturing process. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2013; (2): 18–21 (in Russian).
9. Bondarev VP, Borisevich IV, Volkova RA, Fadeykina OV. Industry reference standards certification for the control of medical immunobiological preparations. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2013; (2): 28–32 (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.

Tomilin VA. 1st professional category expert of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Ivanyutina NL. 2nd professional category expert of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.

Elbert EV. Chief expert of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Volkova RA. Head of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Doctor of Biological Sciences.

Contact e-mails: Tomilin Vladimir Andreyevich; tomilin@expmed.ru
Volkova Rauza Askhatovna; volkova@expmed.ru

Изучение возможности использования метода qPCR для контроля отсутствия микоплазменной контаминации в клеточных культурах

Н. Д. Ёлшин, А. В. Петров

Федеральное государственное унитарное предприятие
«Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»
Федерального медико-биологического агентства,
197110, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Пудожская ул., д. 7

Поступила 08.06.2017 г. Принята к публикации 04.07.2017 г.

Микоплазмы — основные контаминанты клеточных культур. Персистируя в клеточных культурах, микоплазмы многообразно влияют на функционирование клеток-хозяев. Проведение экспериментов на таких контаминированных клетках нерационально, как и наработка в них белка. Цель работы — изучить возможность быстрого выявления контаминации микоплазмами культур клеток и биотехнологических продуктов с воспроизведением ранее разработанной методики, при внесении в нее упрощающих модификаций, повышающих доступность такого анализа в России, а также оценить возможность валидации методики для контроля в процессе производства. Из уже существующих методик детекции микоплазмы методом qPCR (quantitative PCR) была выбрана наиболее пригодная для работы, произведена модификация анализа: дорогостоящие и недоступные к синтезу в России MGB-зонды были заменены на обычные флуоресцентные. Воспроизводимость и чувствительность модифицированной методики были изучены на примере работы с *M. hominis*. Чувствительность данного теста достигает 10 генных копий микоплазм на реакцию. На основании сопоставления полученных результатов и регламентируемых нормативными документами требований к методам детекции микоплазм сделан вывод, что предложенная методика на основе qPCR анализа хорошо подходит для своевременной и регулярной проверки культур клеток на предмет контаминации микоплазмами, теоретически нет никаких противоречий с современной регламентирующей документацией для использования этого метода в качестве основного.

Ключевые слова: микоплазмы; контаминация клеточных культур; qPCR определение микоплазм; контроль качества биотехнологических продуктов.

Библиографическая ссылка: Ёлшин НД, Петров АВ. Изучение возможности использования метода qPCR для контроля отсутствия микоплазменной контаминации в клеточных культурах. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(3): 173–179.

Представители класса Mollicutes — микоплазмы — являются самыми малыми из ныне известных прокариот, способных к самовоспроизведению. Обладая малым количеством генетической информации, скудными синтетическими возможностями и не имея клеточной стенки, микоплазмы занимают широкую экологическую нишу и распространены практически повсеместно исключительно благодаря сосуществованию с высшими эукариотами.

Обнаруженная впервые 60 лет назад контаминация клеточных культур микоплазмами — сейчас уже хорошо известная любому биотехнологу проблема. Хотя имеется много данных о высоких уровнях контаминации культур в лабораториях [1], очевидно, что с ростом озабоченности этой проблемой очищение от микоплазмы должно происходить стремительно, учитывая хорошо разработанные методы эрадикации [2]. Источником спонтанного заражения сред является сам исследователь или компоненты сред (сыворотки крови животных).

Микоплазмы — основные контаминанты клеточных культур [3]. Урон, который наносится микоплазмами исследованию или производству многообразен. Обедняя среду, микоплазма, как минимум, угнетает клеточный рост культуры. Персистируя в культуре, микоплазмы могут приводить к целому спектру повреждений клеток: от почти незаметных морфологических изменений до апоптоза [4]. Микоплазмы изменяют различные свойства культивируемых клеток: метаболизм, пролиферацию, сигналинг и экс-

прессию генов [5]. Их присутствие в клетках может вызывать нарушения целостности мембран клеток-хозяев и функционирования мембранных рецепторов. Микоплазмы ингибируют слияние клеток при работе с гибридной технологией, влияют на стабильность малых интерферирующих РНК [6]. Показано, что при такой контаминации происходит повреждение хромосом клеток-хозяев [7].

Таким образом, сложно правильно интерпретировать любые результаты исследования, проведенного на линии клеток, зараженной микоплазмой. Также, безусловно, недопустима контаминация терапевтических продуктов микроорганизмами. Нецелесообразным является любое ведение линий, зараженных микоплазмой, следовательно, возникает необходимость постоянного контроля возможной контаминации.

Образцы для анализа

Образцами для анализа в большинстве случаев служат образцы ДНК, выделенной из клеток и супернатантов клеточных культур. Хотя это и возможно, но образцы супернатантов без выделения ДНК при анализе лучше не использовать, поскольку ПЦР часто ингибируется компонентами сред или секретируемыми белками, в таком случае внутреннего контроля реакции особенно актуален. Для выделения ДНК из клеточных культур доступен набор

и протоколов для самостоятельного приготовления необходимых буферов.

Отечественная фармакопея описывает испытание на присутствие микоплазм для посевных клеток, мастер банка, рабочих банков, производственных и контрольных клеточных культур, посевного и рабочего вирусных банков, готового лекарственного препарата, которые согласно нормативной документации не должны содержать микоплазм [8].

Методы определения микоплазм

Микоплазмы сложно детектируются, так как не видны при фазово-контрастной микроскопии и многие имеют очень низкую скорость роста в культуре. Микоплазмы столь малы (0,15–0,3 мкм), что могут проходить через фильтры, через которые обычно фильтруют культуральные среды. При этом даже их огромное количество в среде невозможно определить визуально.

Методы, которыми может определяться присутствие микоплазм, в соответствии с требованиями отечественной [8] и Европейской фармакопей [9]: культуральный (микробиологический) метод и цитохимический (метод индикаторной клеточной культуры). В отечественной фармакопее разрешено использование альтернативных методов исследования, однако отсутствуют рекомендации по валидации. Подходы к валидации методов амплификации нуклеиновых кислот для определения присутствия микоплазм имеются в Европейской фармакопее.

Культуральный метод. Рекомендован в последних изданиях американской, европейской, японской фармакопей в качестве «золотого стандарта» определения микоплазм, имеет ряд недостатков [10]:

- длительное время анализа — требует 28 суток,
- чувствительность теста сильно зависит от правильного приготовления сред и качества компонентов сред,
- ложноотрицательные результаты также могут быть получены из-за неправильного хранения образца перед анализом: на жизнеспособность микоплазм может повлиять время и температура хранения образца, т.е. не будут обнаружены присутствующие, но уже нежизнеспособные микоплазмы.

Несмотря на эти недостатки, в фармакопеях рекомендовано в качестве основного метода для определения микоплазм использовать именно культуральный метод.

Метод индикаторной клеточной культуры. Основан на внесении испытуемого образца в клеточную культуру, чувствительную к микоплазмам (обычно Vero), и последующей обработке культуры клеток специфическим флуоресцирующим красителем Hoechst-33258. После инкубации с красителем его сливают и микроскопируют клетки в люминесцентном микроскопе. Недостатки этого метода: длительное время анализа (инкубация в течение 5 суток), метод не прост в использовании, необходимы специальная клеточная культура, среды, а также люминесцентный микроскоп.

Методы амплификации нуклеиновых кислот. Самым простым и доступным из этой группы методов является ПЦР (полимеразная цепная реакция) — многократное увеличение количества копий представленной в образце ДНК при наличии необходимых компонентов реакции (нуклеотиды, ДНК-полимераза, праймеры) и термостатирования. За счет увеличения количества копий достигается высокая чувствительность метода. При срав-

нении метода индикаторной клеточной культуры, культурального метода и методов амплификации нуклеиновых кислот, по фактической чувствительности ПЦР проигрывает культуральному методу, однако многократно выигрывает по времени — скорость анализа методом ПЦР в реальном времени с учетом выделения ДНК занимает 3–4 часа. Данный метод однозначно наилучшим образом подходит для быстрой рутинной проверки образцов на присутствие микоплазм. Также только такой быстрый метод, как ПЦР, может быть использован для проверки промежуточных продуктов, таких как биомасса из биореактора, которую часто необходимо подвергать немедленной обработке.

Целью работы являлось изучение возможности быстрого выявления контаминации микоплазмами клеточных линий и биотехнологических продуктов с воспроизведением ранее разработанной методики, при внесении в нее упрощающих модификаций, повышающих доступность такого анализа в России, а также после определения чувствительности оценить возможность валидации методики для контроля на производстве.

Материалы и методы

Реагенты и оборудование. Смесь для ПЦР (в расчете на одну реакцию 25 мкл): 0,4 мкл HS Taq ДНК полимеразы («Евроген», Россия, PK015L), 2,5 мкл буфера для ПЦР, поставляемого вместе с полимеразой (10×), 2 мкл смеси дезоксирибонуклеотидов по 2,5 мМ каждого («Sigma», США, DNTP100A), вода 7,6 мкл. Праймеры и зонды смешивали заранее, такая смесь содержала каждого смыслового праймера 4 мМ/л, 2 мМ/л каждого антисмыслового праймера, 2 мМ/л каждого зонда, 0,8 мМ/л, 0,4 пг/мл внутреннего контроля. В реакцию общим объемом 25 мкл такой смеси добавляли 2,5 мкл и 10 мкл исследуемого образца. В работе использовали систему определения ПЦР в режиме реального времени iCycler IQ5 («Bio-Rad», США) и соответствующее стандартное программное обеспечение. Cq (Ct; Threshold cycle) определялся автоматически.

Выделение ДНК. Производили с использованием самостоятельно приготовленных буферов [11] по методике, основанной на лизисе клеток и денатурации комплексов ДНК и белков в растворе гуанидина тиоционата.

Праймеры и зонды. Последовательности праймеров, зондов, а также внутреннего контроля, разработанные К. Janetzko с соавт. [12], приведены в таблице 1. Использованные в работе зонды приведены в таблице 2. Праймеры и зонды были заказаны в компании «Бигль» (Россия), последовательность внутреннего контроля синтезирована компанией «Евроген» (Россия). Использовали двухступенчатый протокол ПЦР: после предварительной денатурации в течение 3 минут при 95 °С проводили 40 циклов амплификации: 15 секунд при 95 °С и 60 секунд при 50 °С.

Стандартный образец. Для измерения чувствительности анализа после его воспроизведения с измененной последовательностью зонда в работе использовали два контрольных образца: контрольный образец от набора ФЕМОФЛОР компании «ДНК-Технология» (Россия), содержащий 10⁶ генных копий микоплазм в 1 мл, и образец лиофилизированных *M. hominis*, который был предоставлен ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Методом титрования в «питательной среде для выявления *M. hominis*» (производства того же института)

была определена концентрация микоплазм в культуре. Культуру микоплазм с содержанием 10^6 КОЕ в 1 мл подвергали последовательному разведению для оценки чувствительности ПЦР-анализа. Используя эти два стандарта было показано, что чувствительность анализа соответствует описанной при использовании MGB-модифицированного зонда.

Несколько лет назад ВОЗ был введен международный стандартный образец микоплазм, который доступен к заказу [13]. Но из-за строгости таможенных правил и сложности правил перевозки микроорганизмов заказать в нашу лабораторию такой стандарт не получилось. Такой валидированный образец хорошо подходит как для проведения экспериментов по чувствительности тестов, так и для валидации методики.

Результаты и обсуждение

Чувствительность воспроизведенной qPCR методики после изменения последовательности зондов

При обзоре литературы по детекции микоплазм видно, что перед исследователями чаще стоит задача определения какого-то одного вида микоплазм. Поскольку клеточные линии могут быть контаминированы различными видами класса Mollicutes (Микоплазмы), для детекции рационально использовать тест, специфичный сразу к

наибольшему возможному количеству видов микоплазм, контаминирующих культуры клеток. Выбранный нами для работы тест удовлетворяет этому требованию: в нашей работе использовались праймеры К. Janetzko с соавт. [12]: немецкими учеными был найден консенсус последовательностей 16S рибосомальной ДНК 18 видов микоплазм (в том числе *Ureaplasma* и *Acholeplasma*), позволяющий проводить амплификацию с ДНК любого из этих видов микоплазм с использованием всего восьми праймеров, а детектировать флуоресценцию с помощью одного, комплементарного ко всем последовательностям зонда (табл. 1). Также авторами была предложена для синтеза последовательность внутреннего контроля и зонд, комплементарный этой последовательности.

Авторами оригинальной тест-системы (К. Janetzko с соавт.) были предложены зонды с MGB (minor groove binding) модификацией. Обычно такие зонды используются для аллель-специфичной ПЦР, так как основным преимуществом такой модификации является большая специфичность к последовательности, чем у немодифицированного олигонуклеотида [14]. В данном случае зонды, вероятно, были модифицированы для теоретически большей стабильности, целесообразность такой модификации без необходимости аллельной дискриминации можно ставить под вопрос. В России олигонуклеотиды с такой модификацией не синтезируют, синтезируют их только компа-

Таблица 1. Оригинальный дизайн праймеров К. Janetzko с соавт. [12]

	Последовательность (5' → 3')	Специфичность
Праймеры		
Myco16sQF1	gcaaagctatagatagatagtagaggt	<i>Mycoplasma orale</i> , <i>M. mycoides</i> , <i>M. capricolum</i> и внутренний контроль
Myco16sQF2	gcraagctatagaratagtagtgaggt	<i>M. arthritidis</i> , <i>M. gallisepticum</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. hyorhinis</i> , <i>M. penetrans</i> , <i>M. pirum</i> , <i>M. salivarium</i> , <i>M. synoviae</i>
Myco16sQF3	gcaatgctatagatagatagcggaggt	<i>M. arginini</i>
Myco16sQF4	gcaaagctatggagacatagtgaggt	<i>M. fermentans</i>
Myco16sQF5	gcaaagttatggaacataatggaggt	<i>M. pneumoniae</i> , <i>M. genitalium</i>
Myco16sQF6	gcgacgctatagaataatagttgaggt	<i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>U. parvum</i>
Myco16sQF7	gcaaaggctagaataagttcggagggc	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
Myco16sQR1	gttgcgctcgttgcgggac	Bce Mollicutes
Myco16sQR2	gttgcgctcgttgcaggac	Bce Mollicutes и внутренний контроль
Зонды		
Myco16sQProbe	FAM-tggtgcatggtgttc-MGB	Bce Mollicutes
Myco16sQICProbe	VIC-cacgcccgtaaacga-MGB	Внутренний контроль
Внутренний контроль		
Myco16sQIC**	ggcaaagctatagatagatagtagaggttagtccacgccgtaaacgata tgctcgcaagagtaaccttcgcaaagctatagtcctgcaacgagcgcaacc	

Таблица 2. Зонды для детекции ДНК микоплазм и внутреннего контроля

Зонд	Последовательность (5' → 3')	Специфичность
qMycoProbe	FAM-TGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGT-BHQ	Bce Mollicutes
qMycoICProbe	HEX-CACGCCGTAAACGATATGCTCGCAAGAGTA-BHQ	Внутренний контроль

Примечания. Последовательность ДНК внутреннего контроля ПЦР содержит сайты для посадки праймеров Myco16sQF1, Myco16sQR2 и зонда Myco16sQICProbe. В зонды, использованные в этой работе, не вносилась MGB-модификация, отсутствие такой модификации компенсировано удлинением зондов с 3'-конца, краситель VIC на зонде к внутреннему контролю в нашей работе был заменен HEX. Объяснение причин внесенных изменений — в тексте.

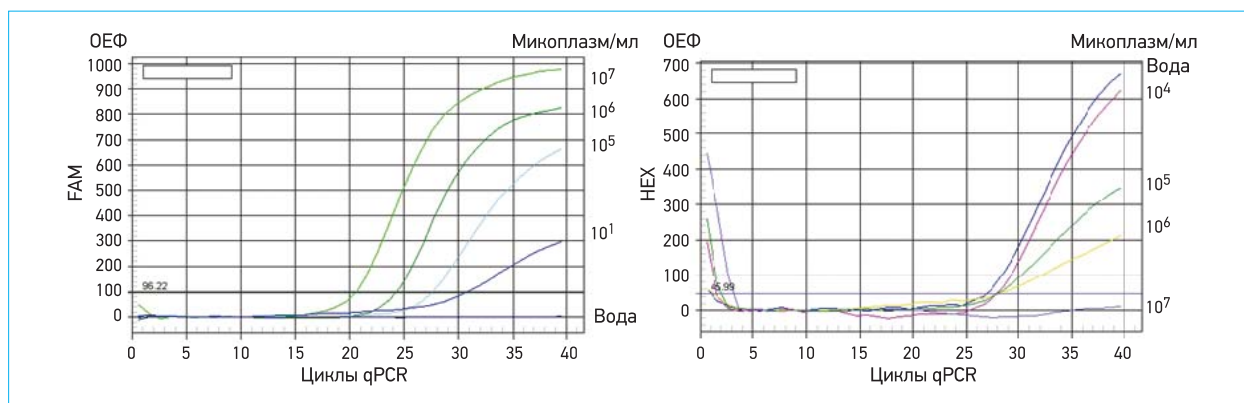


Рис. 1. Графики нарастания флуоресценции при амплификации с ДНК микоплазм (метка FAM) и с ДНК внутреннего контроля (метка HEX). Обе реакции идут в одной пробирке, что позволяет детектировать ложноотрицательные результаты, связанные с присутствием ингибиторов ПЦР в образцах. Справа от графиков указана концентрация генных копий микоплазм на 1 мл в образце, в реакцию вносилось 10 мкл образца.

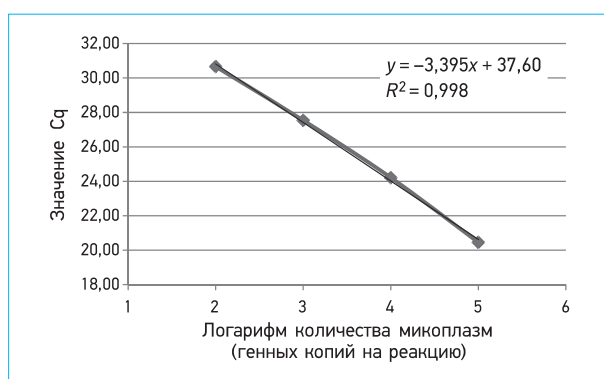


Рис. 2. Стандартная кривая qPCR ДНК *M. hominis* в 10-кратных разведениях (10^4 – 10^7 генных копий микоплазм в 1 мл, т.е. 10^2 – 10^5 микоплазм на реакцию).

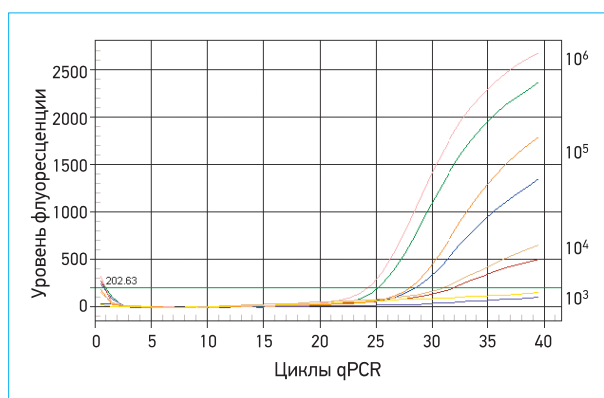


Рис. 3. Графики нарастания флуоресценции при амплификации с ДНК микоплазм. Выделение ДНК производилось вместе с клетками (5 млн. клеток СНО на выделение) и без них. Запоздавающие на 0,5–1 цикла кривые — реакции на матрице образцов ДНК микоплазм, смешанных с клетками; опережающие — выделение ДНК производилось только из клеток микоплазм. Справа от графиков указана концентрация микоплазм на 1 мл в образце, в реакцию вносилось 10 мкл образца.

ния «Applied Biosystems» и стоимость MGB-модифицированных зондов более чем в 10 раз превосходит стоимость обычных. Поэтому, несмотря на хорошо подобранные ав-

торами места для посадки праймеров и зондов, для экономии времени и средств необходимо было внести изменения в структуру зондов.

В связи с этим нами были заказаны флуоресцентные зонды без MGB-модификации, удлиненные относительно оригинальных (для достижения необходимой температуры плавления) на 3'-конце и с тушителем BHQ (Black Hole Quencher) на 3'-конце. При этом в случае зонда, детектирующего ДНК микоплазм, был соблюден консенсус детектируемых последовательностей — один зонд остается комплементарным ко всем 18 последовательностям. Чувствительность анализа после модификации была проверена на единственном доступном нам виде микоплазм (два образца из разных источников) с известной концентрацией — *M. hominis*. Было показано, что после произведенных модификаций чувствительность теста не снизилась относительно заявленной в оригинальной статье (рис. 1). Такие же результаты были показаны для зонда к внутреннему контролю, хотя в данном случае это менее значимо: ПЦР с зондом без MGB-модификации, предложенным в таблице 2, обладает такой же чувствительностью, что и по данным оригинальной статьи.

При вынужденной работе с одним видом микоплазм, мы не можем однозначно утверждать, что чувствительность теста не снизилась для обнаружения других видов. Однако, учитывая, что модифицированный зонд комплементарен к одной и той же последовательности геномов 18 обозначенных видов микоплазм, теоретическая вероятность этого очень высока.

Важной для валидации опцией теста является разработанный внутренний контроль. В реакцию добавляется олигонуклеотид размером в 100 нуклеотидов (Mycos16sQIC) и флуоресцентный зонд (Mycos16sQICProbe), комплементарный ему. При этом флуоресцентная метка на зонде к внутреннему контролю отличается от метки на зонде к последовательности ДНК микоплазм (Mycos16sQProbe), что позволяет проводить мультиплексный анализ в одной пробирке. При отсутствии флуоресценции от метки зонда Mycos16sQProbe, происходит ПЦР на матрице внутреннего контроля и детектируется флуоресценция зонда Mycos16sQICProbe (рис. 1). Так верифицируется отсутствие ингибиторов ПЦР в образце и доказывается, что отсутствие амплификации связано непосредственно с отсутствием матрицы — ДНК микоплазм. Таким образом, внутрен-

ний контроль реакции обеспечивает детекцию ложноотрицательных результатов.

При выделении ДНК для анализа, обычно потери ее отсутствуют или невелики, однако в данном случае для правильной количественной оценки контаминации процент выхода ДНК нуждается в валидации. Отдельный вопрос вызывает анализ клеточных культур и вероятное снижение выхода ДНК в ходе совместного выделения ДНК клеток культуры и ДНК потенциально присутствующих клеток микоплазм. Для оценки возможных потерь ДНК микоплазм при выделении из смеси клеток микоплазм и клеток культуры, нами были проведены предварительные эксперименты по оценке пропорциональности выделения. Известные количества микоплазм добавлялись к 5 миллионам живых клеток CHO, после чего из этой смеси производилось выделение ДНК и qPCR на матрице выделенных образцов. По нашим данным, выход ДНК микоплазм незначительно снижался (на 30 %), но, вероятно, это связано с неоптимизированной под данную задачу технологией выделения ДНК, выделение производилось только с использованием самостоятельно приготовленных буферов (рис. 3). При выделении ДНК в данном случае важно не превышать емкость сорбента.

Чувствительность методики qPCR и требования фармакопей

Метод ПЦР обычно рекомендуется как дополнительный к культуральному и цитохимическому [15]. Однако одной из задач исследования являлось выяснение возможности использования данной модифицированной методики ПЦР как основной для контроля отсутствия микоплазм.

В отечественной фармакопее разрешено использование альтернативных методов исследования, однако не имеется рекомендаций по валидации и не предъявляются требования к чувствительности метода. В такой ситуации логично ориентироваться на Европейскую фармакопею, особенно в условиях переориентации производств на международные стандарты GMP. Подходы к валидации методик амплификации нуклеиновых кислот (АНК) для определения присутствия микоплазм имеются в Европейской фармакопее, начиная с издания 8.0.

Требуемая чувствительность метода по данным этого руководства должна достигать 10–100 КОЕ/мл [9]. В ПЦР анализируется не более 10 мкл образца. Так, анализируя 10 мкл образца, мы не можем напрямую достичь чувствительности 10 КОЕ/мл даже теоретически, так как при этом в реакции окажется 0,1 КОЕ, т.е. ни одной микоплазмы. По данным литературы и по нашим данным — пределом детекции является 10–50 генных копий микоплазм на реакцию (в зависимости от вида микоплазм), при пересчете на 1 мл получается 1000–5000 микоплазм/мл. В случае *M. hominis* предел детекции оказывается в диапазоне 20–30 генных копий на реакцию.

Для соответствия требованию можно воспользоваться ячейками для ультрацентрифугирования (например, Sartorius Vivaspin или Amicon Ultra Centrifugal Filters), которые позволяют сконцентрировать образцы более чем в 100 раз. Так, объем 10 мл можно сконцентрировать до 50 мкл, тем самым увеличив концентрацию потенциально присутствующих микоплазм более чем на два порядка. После концентрирования образца становится возможной детекция 10–50 генных копий в 1 мл, что удовлетворяет

указанным выше требованиям. Концентрирование образца при помощи специальных приспособлений — процесс быстрый (от 10 минут) и простой — потребуется только центрифуга.

Отдельный вопрос, результаты обсуждения которого обычно являются аргументом в пользу методов АНК, — уровень соотношения генных копий и КОЕ. При сравнении чувствительности культурального метода и методов АНК, обычно основываются на предположении, что 1 КОЕ соответствует 1 клетке микоплазмы, содержащей одну генную копию с одним локусом 16S rDNA. Однако соответствие 1 КОЕ одной микоплазме не совсем верно. Определение КОЕ неточное, так как сильно зависит от условий культивирования, разницы в скорости роста разных видов микоплазм и субъективной интерпретации результатов [4]. Большие колонии могут быть результатом роста более чем одной клетки микоплазмы. Результаты экспериментов показывают, что соотношение КОЕ/генные копии варьирует от 5 до 5000 генных копий на 1 КОЕ [10, 16].

Таким образом, метод qPCR, в том числе при использовании описанной в статье методики, может быть использован не только для рутинного или срочного анализа образцов на присутствие микоплазм, но и, с использованием концентрирования образцов и при должной валидации, для контрольных анализов на производстве. Для такой работы в первую очередь необходимо получение стандартных образцов микоплазм разных видов.

Выводы

Для анализа клеточных линий и биотехнологических продуктов была выбрана наиболее подходящая методика, однако, нуждавшаяся в модификации. После внесенных в методику изменений по замене MGB-зондов на менее дорогие и доступные в Российской Федерации флуоресцентные зонды не обнаружено снижения чувствительности теста на примере работы с *M. hominis*.

Чувствительность данной модификации методики qPCR достигает 10 генных копий микоплазм на реакцию, при концентрировании образца это значение может быть многократно увеличено.

Литература

1. Langdon SP. Cell culture contamination: an overview. *Methods Mol Med*. 2004; 88: 309–17.
2. Uphoff CC, Denkmann SA, Drexler HG. Treatment of mycoplasma contamination in cell cultures with Plasmocin. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 267678.
3. Rottem S, Barile MF. Beware of mycoplasmas. *Trends Biotechnol*. 1993; 11(4): 143–51.
4. Stemke GW, Robertson JA. Comparison of two methods for enumeration of mycoplasmas. *J Clin Microbiol*. 1982; 16(5): 959–61.
5. Olarerin-George AO, Hogenesch JB. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq archive. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43(5): 2535–42.
6. van Kuppeveld FJ, van der Logt JT, Angulo AF, van Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol*. 1992; 58(8): 2606–15.
7. Lincoln CK, Gabridge MG. Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination. *Methods Cell Biol*. 1998; 57: 49–65.
8. ОФС. 1.7.2.0031.15. Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2. М.; 2015. С. 827–35. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.

9. 2.6.7. *Mycoplasmas*. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://pharmeuropa.edqm.eu/ep900>.
10. Volokhov DV, Graham LJ, Brorson KA, Chizhikov VE. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: Review of alternative non-microbiological techniques. *Mol Cell Probes* 2011; 25(2–3): 69–77.
11. Ёлшин НД. Определение остаточной ДНК клеток-продуцентов *E. Coli* и *CHO* в субстанциях рекомбинантных белков методом qPCR. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2016; 16(4): 245–52.
12. Janetzko K, Rink G, Hecker A, Bieback K, Kluter H, Bugert P. A single-tube real-time PCR assay for Mycoplasma detection as a routine quality control of cell therapeutics. *Transfus Med Hemother*. 2014; 41(1): 83–9.
13. 1st WHO International Standard for mycoplasma DNA for nucleic acid amplification technique-based assays designed for generic mycoplasma detection. Available from: <https://goo.gl/Ue2xP9>.
14. Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, et al. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(2): 655–61.
15. Шалунова НВ, Волкова РА, Волгин АР, Петручук ЕМ, Бердникова ЗЕ, Эльберт ЕВ и др. Микоплазмы — контаминанты клеточных культур. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2016; 16(3): 151–60.
16. Peredelchouk M, David SA, Bhattacharya B, Volokhov DV, Chizhikov V. Detection of mycoplasma contamination in cell substrates using reverse transcription-PCR assays. *J Appl Microbiol*. 2011; 110(1): 54–60.

Об авторах

Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства, 197110, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Пудожская ул., д. 7.
 Ёлшин Никита Дмитриевич. Младший научный сотрудник лаборатории иммунофармакологии.
 Петров Александр Владимирович. Начальник лаборатории иммунофармакологии.

Адрес для переписки: Ёлшин Никита Дмитриевич; nikita.yolshin@gmail.com

Possibilities of qPCR control of mycoplasma contamination of cell cultures

N. D. Yolshin, A. V. Petrov

Federal State Unitary Enterprise
 «State Research Institute of Highly Pure Biopreparations»
 of the Federal Medico-Biological Agency
 Pudojskaya st. 7, St. Petersburg 197110, Russian Federation

Mycoplasmas are the main contaminants of cells cultures. They persist in cell cultures and can extensively affect host cell functions. Conducting experiments or producing protein in contaminated cultures are impractical. The aim of the study was to explore the possibility of quick detection of mycoplasma contamination of cell cultures and biotechnological products by a previously developed method which was modified to make it simpler and more affordable in Russia; and to assess the possibility of method validation for quality control. The authors chose the most applicable qPCR method of all qPCR methods currently used for mycoplasma detection, and modified it in the following way: expensive MGB-probes which cannot be synthesized in Russia were substituted by ordinary fluorescence probes. The reproducibility and sensitivity of the modified method were tested with *M. hominis*. The sensitivity of the test was equal to 10 mycoplasma gene copies per reaction. Comparison of the obtained results with regulatory requirements for mycoplasma detection showed that the proposed method complies with current official requirements and could be used as the main method for routine prompt cell culture testing for mycoplasma contamination.

Key words: mycoplasma; cell culture contamination; qPCR mycoplasma detection; biotechnological products quality control.

For citation: Yolshin ND, Petrov AV. Possibilities of qPCR control of mycoplasma contamination of cell cultures. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(3): 173–179.

References

1. Langdon SP. Cell culture contamination: an overview. *Methods Mol Med*. 2004; 88: 309–17.
2. Uphoff CC, Denkmann SA, Drexler HG. Treatment of mycoplasma contamination in cell cultures with Plasmocin. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 267678.
3. Rottem S, Barile MF. Beware of mycoplasmas. *Trends Biotechnol*. 1993; 11(4): 143–51.
4. Stemke GW, Robertson JA. Comparison of two methods for enumeration of mycoplasmas. *J Clin Microbiol*. 1982; 16(5): 959–61.
5. Oларерин-George AO, Hogenesch JB. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq archive. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43(5): 2535–42.
6. van Kuppeveld FJ, van der Logt JT, Angulo AF, van Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol*. 1992; 58(8): 2606–15.
7. Lincoln CK, Gabridge MG. Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination. *Methods Cell Biol*. 1998; 57: 49–65.
8. OFS. 1.7.2.0031.15. Testing for the presence of mycoplasma. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. 13th ed. V. 2. P. 827–35. Available from: <http://www.femb.ru/femb>.
9. 2.6.7. *Mycoplasmas*. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://pharmeuropa.edqm.eu/ep900>.
10. Volokhov DV, Graham LJ, Brorson KA, Chizhikov VE. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: Review of alternative non-microbiological techniques. *Mol Cell Probes* 2011; 25(2–3): 69–77.

11. Yolshin ND. Detection of residual *E. coli* and CHO host-cell DNA in recombinant proteins by qPCR. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(4): 245–52 (in Russian).
12. Janetzko K, Rink G, Hecker A, Bieback K, Kluter H, Bugert P. A single-tube real-time PCR assay for *Mycoplasma* detection as a routine quality control of cell therapeutics. *Transfus Med Hemother*. 2014; 41(1): 83–9.
13. 1st WHO International Standard for mycoplasma DNA for nucleic acid amplification technique-based assays designed for generic mycoplasma detection. Available from: <https://goo.gl/Ue2xP9>.
14. Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, et al. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(2): 655–61.
15. Shalunova NV, Volkova RA, Volgin AR, Petruchuk EM, Berdnikova ZE, Elbert EV, et al. *Mycoplasma* contamination of cell cultures. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(3): 151–60 (in Russian).
16. Peredeltchouk M, David SA, Bhattacharya B, Volokhov DV, Chizhikov V. Detection of mycoplasma contamination in cell substrates using reverse transcription-PCR assays. *J Appl Microbiol*. 2011; 110(1): 54–60.

Authors

Federal State Unitary Enterprise «State Research Institute of Highly Pure Biopreparations» of the Federal Medico-Biological Agency, Pudojskaya st. 7, St. Petersburg 197110, Russian Federation.

Yolshin ND. Junior research scientist of the Immunopharmacology Laboratory.

Petrov AV. Head of the Immunopharmacology Laboratory.

Contact e-mail: Yolshin Nikita Dmitrievich; nikita.yolshin@gmail.com

Изучение диагностической значимости иммунореактивных эпитопов протеаз семейства OmpTn с использованием пептидной библиотеки

В. А. Федорова^{1,2}, М. А. Хижнякова^{1,2}, С. С. Зайцев¹, А. М. Ляпина¹,
Л. В. Саяпина³, Е. П. Ляпина⁴, О. В. Ульянова¹, В. Л. Мотин⁵

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии, филиал в г. Саратове,
Саратов, Российская Федерация, 410028, Саратов, ул. 53-й Стрелковой Дивизии, д. 6.

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Саратовский государственный аграрный университет имени Н. И. Вавилова»,
410012, Российская Федерация, г. Саратов, Театральная площадь, д. 1

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
127051, Российская Федерация, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
410012, Российская Федерация, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112

⁵ Университет Техаса, факультет медицины,
77555, США, Техас, г. Галвестон, Университетский бульвар, д. 301

Поступила 03.07.2017 г. Принята к публикации 04.07.2017 г.

Конструирование высокочувствительных диагностических тест-систем нового поколения требует использования современных инновационных технологий, позволяющих выявлять возбудителей инфекционных заболеваний на молекулярном уровне путем выявления специфических антител к индивидуальным иммунореактивным эпитопам. Разработка таких иммуногестов основана на молекулярном картировании таргетного антигена с применением библиотеки коротких перекрывающихся пептидов, направленных на идентификацию антигенной детерминанты как специфической для конкретного патогена, так и эпитопов, общих для группы возбудителей инфекционных заболеваний. В статье изложены новые подходы к совершенствованию ретроспективной лабораторной диагностики инфекционных болезней, вызываемых бактериями семейства Enterobacteriaceae, основанные на результатах картирования модельного белка группы OmpTn. Обсуждаются перспективы апробации экспериментального варианта пептидного твердофазного иммуноферментного анализа, обозначенного как р6/24-OmpTn-ТИФА, для выявления антител к диагностически значимым эпитопам OmpTn, в сыворотках крови людей, переболевших энтеробактериальными инфекциями, с целью дальнейшего внедрения в практическое здравоохранение.

Ключевые слова: лабораторная диагностика; пептидный эррей; твердофазный иммуноферментный анализ; OmpTn; Enterobacteriaceae; ретроспективная диагностика; иммунореактивный эпитоп.

Библиографическое описание: Федорова ВА, Хижнякова МА, Зайцев СС, Ляпина АМ, Саяпина ЛВ, Ляпина ЕП, Ульянова ОВ, Мотин ВЛ. Изучение диагностической значимости иммунореактивных эпитопов протеаз семейства OmpTn с использованием пептидной библиотеки. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(3): 180–186.

Согласно статистическим данным, ежегодно в Российской Федерации регистрируется от 40 до 60 миллионов случаев инфекционных болезней, вызываемых представителями семейства Enterobacteriaceae, с тенденцией к устойчивому росту количества групповых заболеваний дизентерией и другими кишечными инфекциями [1]. По данным Роспотребнадзора в 2016 году сальмонеллезные инфекции выросли на 14,7 % и составили 12,97 на 100 тыс. населения против 11,31 за тот же период 2015 года [2].

Известно, что эффективный контроль за распространением инфекционных заболеваний во многом зависит от доступности современных мультиплексных тестов, позволяющих осуществлять диагностические мероприятия, в том числе и ретроспективно. В то же время совершенствование лабораторной диагностики бактериальных инфек-

ций во многом определяется использованием для конструирования диагностических тест-систем нового поколения высокоточных технологий в сочетании с применением индивидуальных молекулярных мишеней детектируемых патогенов.

Для выявления последних в настоящее время широко распространена технология пептидного ELISA (от англ. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) или пептидного твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) с использованием сывороточных антител реконвалесцентов или привитых людей для оценки иммунного статуса. Выяснено, что такой подход с помощью панели иммунных сывороток позволяет прояснить специфичность тестируемых антител на молекулярном уровне, т.е. фактически картировать таргетный (гомологичный) антиген на уровне от-

дельного эпитопа, с выявлением антигенной детерминанты распознаваемой специфичности. Наиболее распространенным и оптимальным для реализации указанной цели считается использование библиотеки коротких перекрывающихся пептидов, способных специфически «узнавать» индивидуальные эпитопы белковых антигенов возбудителей инфекционных заболеваний, обеспечивая тем самым высокую точность диагностики на молекулярном уровне [3].

Белки внешней мембраны, представляющие собой интегральные мембранные протеазы семейства OmpT, известные как OmpTin, являются признанными ключевыми факторами вирулентности для различных грамотрицательных патогенов, включая бактерии семейства Enterobacteriaceae [4]. Локализация на внешней мембране бактериальных клеток во многом определяет их выраженные антигенные свойства и важную роль во взаимодействии микро- и макроорганизма. Доказана иммуномодулирующая активность белков OmpTin и непосредственное участие в иммуно- и патогенезе соответствующих инфекционных заболеваний [5–7]. Одним из наиболее изученных представителей семейства OmpTin считают активатор плазминогена (Pla) *Yersinia pestis* [8–11]. Ранее было показано, что белки этой группы принимают участие в формировании иммунного ответа к Pla с выработкой гомологичных антител у лабораторных моделей и людей [12, 13]. Применение панели моноклональных антител позволило детектировать у данного представителя белков OmpTin эпитопы как специфические для гомологичного возбудителя, так и общие для семейства Enterobacteriaceae [14]. Очевидно, что последние могут иметь важное значение в ретроспективной диагностике инфекционных заболеваний, вызванных энтеробактериями. Вместе с тем конструирование современных высокочувствительных диагностических тестов невозможно без картирования Pla и определения на молекуле данного антигена конкретных иммунореактивных эпитопов.

Целью исследования было выявление иммунореактивных пептидов Pla в сыворотках крови людей, переболевших энтеробактериальными инфекциями, с использованием библиотеки перекрывающихся пептидов и определение их диагностической значимости.

В задачи исследования входило проведение исследований по выявлению диагностически значимых иммунореактивных пептидов у модельного белка группы OmpTin с последующим конструированием экспериментального варианта ТИФА и предварительной оценкой перспектив дальнейших испытаний разрабатываемого пилотного варианта данной модификации иммуноанализа для ретроспективной диагностики инфекционных заболеваний, вызванных энтеропатогенными возбудителями.

Материалы и методы

В исследовании использовали сыворотки крови людей ($n = 12$), переболевших ранее (от 3 до 30 лет назад) энтеробактериальными инфекциями (рандомизированная выборка без учета конкретных нозологий). Эти сыворотки крови содержали, по данным предварительных исследований, детектируемый уровень антител к рекомбинантному препарату Pla, очищенному с применением аффинной хроматографии после клонирования в *Escherichia coli* в

виде «фьюжн»/fusion пептида, меченного шестью последовательно расположенными остатками гистидина, известного как His-Tag (от англ. Histidine-Tag) [15, 16].

Определение иммунореактивных пептидов проводили с применением библиотеки перекрывающихся 59 синтетических пептидов (GenScript, США), подготовленной в соответствии с данными генного банка о последовательности гена, кодирующего Pla [17]. Размер каждого пептида составлял 15 а.к. с перекрыванием в 10 а.к. с соседним пептидом, с условным обозначением индивидуальных пептидов арабскими цифрами от 1 до 59 (p1–p59 соответственно). Гарантированная степень очистки пептидов – не менее 95 %. Все исследуемые сыворотки были зашифрованы и обозначены номерами 1–12. Анализ выполняли методом ТИФА с использованием 96-луночных планшетов с повышенной сорбционной емкостью («Thermo Scientific», США) в трех повторностях, согласно рекомендациям [3, 18]. Проявление специфических иммунных комплексов вели с применением конъюгата $F(ab')_2$ -фрагментов козьих антител против иммуноглобулинов человека с пероксидазой хрена («Sigma», США). Реакцию визуализировали 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine substrate (TMB) («Sigma», США). В качестве отрицательного контроля использовали лунки планшета без внесения пептидов. Учет результата проводили при длине волны 450 нм с отсекающим фильтром 630 нм. Положительным считали результат в том случае, когда показатели оптической плотности (ОП) экспериментальной лунки превышали в 2 раза показатели ОП отрицательного контроля.

Выравнивание аминокислотных и нуклеотидных последовательностей, кластеризацию и филогенетический анализ проводили в программах ClustalW Omega (<http://www.clustal.org/omega/>) и MEGA версия 6.0 [19], соответственно, форматах UMPGA. Статистическая обработка результатов выполнена с применением программы GraphPad Prism, версия 6.01.

Результаты и обсуждение

Ранее нами показано, что в основе пептидного ТИФА, известного как модификация пептидного эррея, лежит тот же принцип специфического взаимодействия антиген-антитела, что и в традиционном варианте анализа [3, 20]. В настоящем исследовании схема постановки включала сенсibilизацию отдельных пептидов на твердой фазе с последующей блокировкой свободных сайтов, инкубацией с тестируемыми сыворотками и визуализацией образовавшихся специфических иммунных комплексов. Отличительной особенностью по сравнению с классическим способом (рис. 1, а) явилось проведение сенсibilизации путем последовательного внесения пептидов в отдельные лунки планшета, что обеспечивало возможность взаимодействия сывороточных антител с каждым иммунореактивным линейным индивидуальным эпитопом молекулы антигена семейства OmpTin (рис. 1, б).

Проведенные исследования с применением панели из 12 сывороток позволили обнаружить на молекуле Pla как иммунореактивные (20,3 %, 95 % доверительный интервал, ДИ = 10,9–32,8), так и полностью ареактивные пептиды (79,7 %, 95 % ДИ = 67,2–89,0), которые не реагировали ни с одной из тестируемых сывороток (рис. 2). При этом

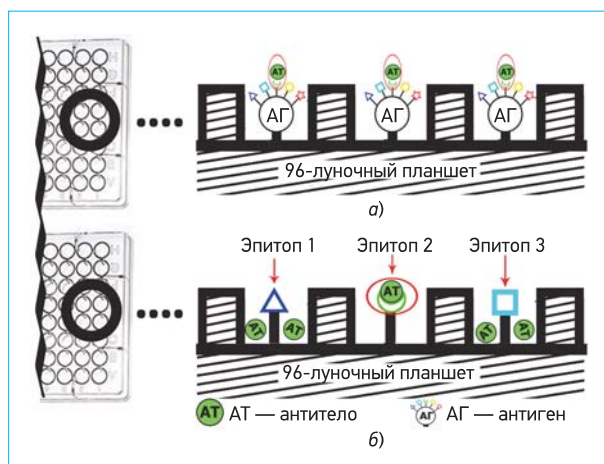


Рис. 1. Схема постановки ТИФА с сенсбилизацией твердой фазы рекомбинантным антигеном Pla (а) и индивидуальными пептидами (б).



Рис. 2. Соотношение иммунореактивных и ареактивных линейных пептидов модельного антигена Pla — представителя Omptin, по данным пептидного ТИФА. Достоверные различия между указанными группами пептидов определяли путем подсчета 95 % ДИ.

полностью ареактивных пептидов оказалось значительно меньше ($p < 0,05$).

По количеству позитивных реакций с тестируемыми сыворотками иммунореактивные пептиды были условно разделены на 4 группы: № 1 — детектировались всеми сыворотками, № 2 — взаимодействовали с более чем 60 % исследуемых образцов, № 3 и 4 обеспечивали позитивные реакции с сывороточными антителами относительно небольшого количества сывороток — от 8 до 50 %. Важно,

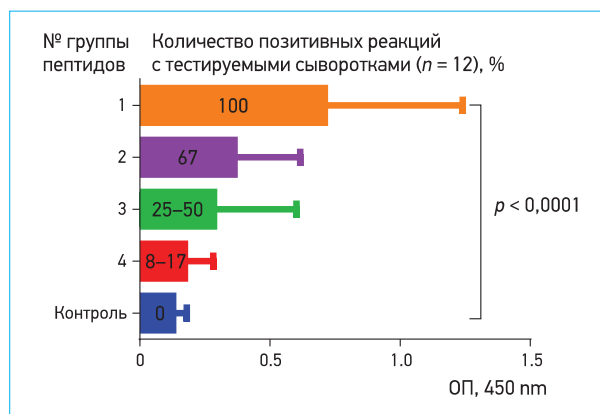


Рис. 3. Сравнительная оптическая плотность (ОП) в ТИФА между группами пептидов (пронумерованы арабскими цифрами 1–4), позитивно реагирующих с 8–17 %, 25–50 %, 67 % и 100 % тестируемых сывороток. Контрольные лунки не содержат антигена. Достоверность определена с применением теста Краскела–Уоллиса.

что наибольшие/максимальные значения ОП регистрировались с пептидами групп № 1 и 2 (рис. 3), что указывает на потенциальную возможность применения их в качестве компонентов диагностических тест-систем.

Действительно, уровень интенсивности ОП позитивных реакций варьировал (рис. 4, а) с превышением значений ОП отрицательного контроля для отдельных иммунореактивных пептидов (Р6, группа 1) в 3,9–15 раз, а для индивидуальных пептидов, реагирующих, по крайней мере, с 25–66 % исследуемых сывороток (Р12, Р24, Р46 и Р55, группы 2–4) — в 2,1–10-кратном диапазоне (рис. 4, б). Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей в области молекулярного картирования антигенов с применением библиотек синтетических пептидов, сообщавших о выраженных различиях в уровне детектируемого цветного сигнала у отдельных доноров [18].

В настоящем исследовании важным следует считать зафиксированный факт принципиальной возможности применения разработанной нами пептидной библиотеки модельного белка семейства Omptin для выявления комплементарных (гомологичных) сывороточных антител у людей, перенесших ранее инфекции, вызванные энтеропатогенными бактериями, аналогично исследованиям, выполненным на других бактериальных моделях [3]. Ана-

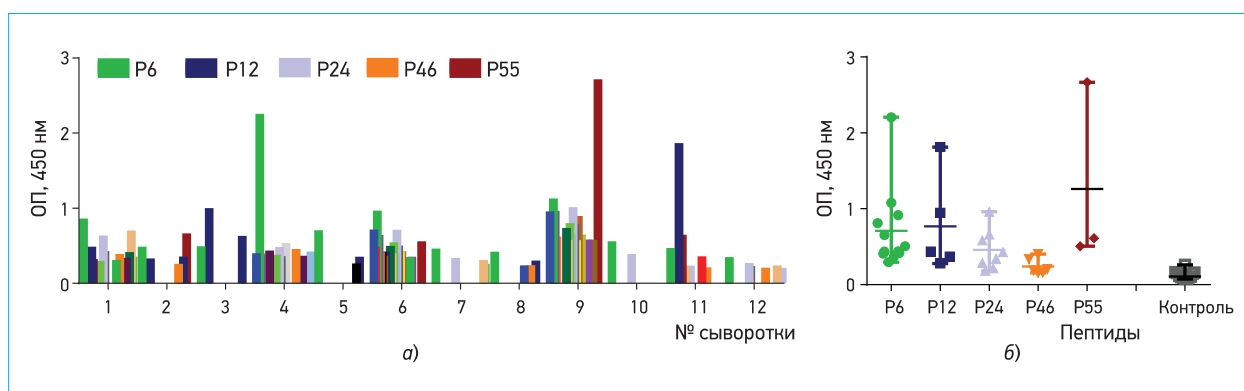


Рис. 4. Определение значений оптической плотности (ОП) в пептидном ТИФА с панелью из 12 зашифрованных сывороток крови волонтеров с анамнестическим серологическим ответом к модельному антигену семейства Omptin и (а) библиотекой синтетических пептидов (бары обозначены разными цветами), (б) включая индивидуальные пептиды (Р6, Р12, Р24, Р46 и Р55), реагирующие с 25–100 % сывороток с максимальным уровнем цветного сигнала ($M \pm m$).

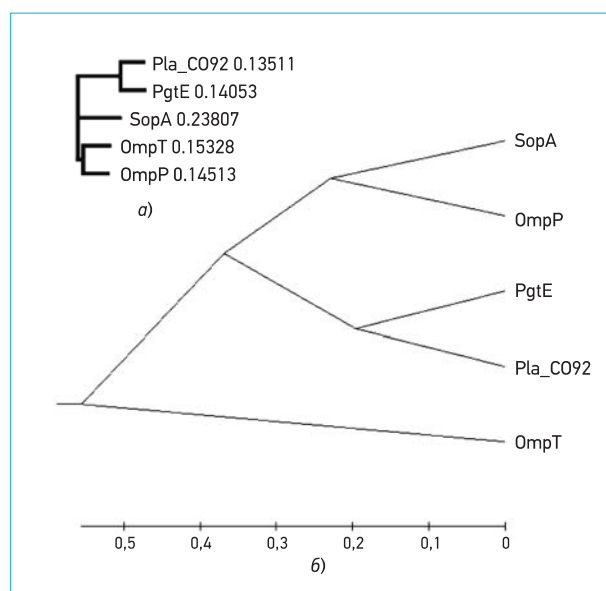


Рис. 5. Кластерный и филогенетический анализ представителей семейства Omptin (Pla, PgtE, SopA, OmpT и OmpP) с применением аминокислотных (а) и нуклеотидных (б) последовательностей в формате UPMGA.

лиз полученных данных позволил обнаружить, по крайней мере, 5 отдельных иммуореактивных пептидов. Однако три пептида (P12, P46 и P55) взаимодействовали только с 42, 50 и 25 % сывороток, и, соответственно, обладали относительно невысокой диагностической значимостью. В то же время два пептида (P6 и P24) обеспечивали более половины положительных реакций со всеми тестируемыми сыворотками и, по-видимому, являлись группоспецифическими. На наш взгляд, применение данных антигенов в качестве сенситива указывает на возможность разработки на их основе экспериментального варианта пептидного ТИФА, обозначенного нами как P6/24-Omptin-ТИФА, для ретроспективной диагностики инфекционных болезней.

Проверка генетической детерминированности иммуносерологического родства путем сравнительного анализа белковой последовательности молекулы Pla с другими протеазами семейства Omptin подтвердила их высокую гомологию [11]. Как видно на рисунке 5, а, линейные пептидные последовательности Pla и PgtE (*Salmonella enterica*) формировали единый кластер и обладали невысоким уровнем дискриминации от трех других представителей семейства Omptin: SopA (*Shigella flexneri*), OmpT и OmpP (*E. coli*). Более того, филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей каждого из соответствующих антигенов также указывал на их близкое филогенетическое родство, потенциальное наличие общего предка, относительно низкую степень дифференциации друг от друга (рис. 5, б), что объясняет наличие у белков Omptin группоспецифических антигенных детерминант, имеющих потенциально диагностическое значение. Очевидно, особую важность это может иметь при конструировании мультиплексных тест-систем нового поколения для ретроспективной диагностики инфекционных заболеваний, вызванных энтеропатогенными возбудителями, особенно таких актуальных инфекций, как сальмонеллез, иерсиниозы, шигеллез и эшерихиозы [1, 2].

Кроме того, несомненным преимуществом является возможность проведения иммуносерологической диагностики не одного, а группы инфекционных заболеваний, вызванных представителями семейства Enterobacteriaceae, поскольку основу экспериментального пептидного ТИФА составили группоспецифические пептиды группы Omptin [4–7]. Однако для всесторонней оценки диагностической значимости сывороточных антител к группоспецифическим эпитопам Omptin, а также основных характеристик разрабатываемой тест-системы, требуются дальнейшие медицинские исследования экспериментального варианта P6/24-Omptin-ТИФА с применением расширенной панели сывороток крови людей, переболевшими ранее энтеробактериальными заболеваниями, с последующим внедрением нового диагностического теста в практическое здравоохранение.

Выводы

1. Проведенные исследования зашифрованных сывороток крови людей, переболевших ранее энтеробактериальными инфекционными заболеваниями, позволили выявить диагностически значимые иммуореактивные пептиды (P6 и P24) у модельного белка Pla, обладающие высокой гомологией с другими антигенами группы Omptin представителей семейства Enterobacteriaceae.

2. Показано, что разработанный экспериментальный вариант ТИФА – модификация пептидного ELISA на основе двух маркерных пептидов Omptin (P6 и P24), может быть использован для ретроспективной диагностики инфекционных заболеваний, вызванных энтеропатогенными бактериальными агентами.

3. Определена перспектива дальнейших исследований с проведением медицинских испытаний экспериментального варианта P6/24-Omptin-ТИФА на расширенной панели сывороток крови людей, переболевших инфекционными заболеваниями, вызванными энтеропатогенными бактериями, для последующего внедрения нового диагностического теста в практическое здравоохранение.

Работа выполнена в рамках реализации Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы, а также при частичной поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 16-34-00051 программа «мол_а».

Литература

1. Забонрицкий НА. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации и тенденции ее развития в ближайшее десятилетие. Электронный научно-образовательный вестник Здоровье и образование в XXI веке. 2015; 17(5): 16–26.
2. Роспотребнадзор обнаружил статистику инфекционных болезней за первое полугодие. Available from: <http://www.yaprivat.ru/news/2365/>.
3. Reineke U, Schutkowski M, eds. Methods of Molecular Biology, Epitope Mapping Protocols. Vol. 524. New York: Humana Press; 2009.
4. Hritonenko V, Stathopoulos C. Omptin proteins: an expanding family of outer membrane proteases in Gram-negative Enterobacteriaceae. Mol Membr Biol. 2007; 24(5 – 6): 395–406.
5. Kukkonen M, Korhonen TK. The Omptin family of enterobacterial surface proteases/adhesins: from housekeeping in Escherichia

- coli* to systemic spread of *Yersinia pestis*. *Int J Med Microbiol*. 2004; 294(1): 7–14.
6. Haiko J, Suomalainen M, Ojala T, Lähteenmäki K, Korhonen TK. Invited review: Breaking barriers – attack on innate immune defences by OmpT surface proteases of enterobacterial pathogens. *Innate Immun*. 2009; 15(2): 67–80.
 7. Brannon JR, Thomassin JL, Gruenheid S, Le Moual H. Antimicrobial peptide conformation as a structural determinant of OmpT protease specificity. *J Bacteriol*. 2015; 197(22): 3583–91.
 8. Sodeinde OA, Subrahmanyam YV, Stark K, Quan T, Bao Y, Goguen JD. A surface protease and the invasive character of plague. *Science* 1992; 258(5084): 1004–7.
 9. Куклева ЛМ, Бойко АВ. Активатор плазминогена – многофункциональный белок возбудителя чумы. *Проблемы особо опасных инфекций* 2016; 3: 13–20.
 10. Korhonen TK, Haiko J, Laakkonen L, Järvinen HM, Westerlund-Wikström B. Fibrinolytic and coagulative activities of *Yersinia pestis*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013; 3: 35.
 11. Есеева ВВ, Платонов МЕ, Копылов ПХ, Денцовская СВ, Анисимов АП. Активатор плазминогена чумного микроба. *Инфекция и иммунитет* 2015; 5(1): 27–36.
 12. Easterbrook TJ, Reddin K, Robinson A, Modi N. Studies on the immunogenicity of the Pla protein from *Yersinia pestis*. *Contrib Microbiol Immunol*. 1995; 13: 214–5.
 13. Benner GE, Andrews GP, Byrne WR, Strachan SD, Sample AK, Heath DG, et al. Immune response to *Yersinia* outer proteins and other *Yersinia pestis* antigens after experimental plague infection in mice. *Infect Immun*. 1999; 67(4): 1922–8.
 14. Feodorova VA, Devdariani ZL. Development, characterisation and diagnostic application of monoclonal antibodies against *Yersinia pestis* fibrinolysin and coagulase. *J Med Microbiol*. 2000; 49(3): 261–9.
 15. Braciale VL, Nash M, Sinha N, Zudina IV, Motin VL. Correlates of immunity elicited by live *Yersinia pestis* vaccine. In: Georgiev VS, Western K, McGowan JJ, eds. *National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH. Volume 1: Frontiers in Research*. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. P. 473–80.
 16. Feodorova VA, Khizhnyakova MA, Lyapina AM, Zaitsev SS, Telepnev MV, Sayapina LV, et al. Murine and human early humoral immune responses to *Yersinia pestis* Pla antigen followed by immunization with live plague vaccine: Proceeding Book of the 12th International *Yersinia* Symposium. 2016, Oct. 25–28; Tbilisi; Georgia. P. 38.
 17. *Yersinia pestis* CO92 plasmid pPCP1, complete sequence. NCBI Reference Sequence: NC 003132.1. Available from: <https://goo.gl/26Ag6J>.
 18. Heuzenroeder MW, Barton MD, Vanniasinkam T, Phumoonna T. Linear B-cell epitope mapping using enzyme-linked immunosorbent assay for libraries of overlapping synthetic peptides. *Methods Mol Biol*. 2009; 524: 137–44.
 19. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013; 30(12): 2725–9.
 20. Хижнякова МА, Федорова ВА, Зайцев СС, Мотин ВЛ. Применение пептидных микрочипов для эпигеномного картирования и иммунодиагностики инфекционных заболеваний. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета* 2013; 1(39): 228–30.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии, филиал в г. Саратове, Саратов, Российская Федерация, 410028, Саратов, ул. 53-й Стрелковой Дивизии, д. 6.
Федорова Валентина Анатольевна. Главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологий, д-р мед. наук, профессор.

Хижнякова Мария Александровна. Младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологий.

Зайцев Сергей Сергеевич. Научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологий.

Ляпина Анна Михайловна. Научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологий.

Ульянова Онега Владимировна. Старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологий, канд. мед. наук, доцент.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н. И. Вавилова», 410012, Российская Федерация, г. Саратов, Театральная площадь, д. 1.

Федорова Валентина Анатольевна. Профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии, д-р мед. наук, профессор.

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

Саяпина Лидия Васильевна. Главный эксперт управления экспертизы противобактериальных медицинских иммунобиологических препаратов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов, д-р мед. наук.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 410012, Российская Федерация, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112.

Ляпина Елена Павловна. Профессор кафедры инфекционных болезней, д-р мед. наук.

Университет Техаса, Факультет Медицины, 77555, США, Техас, г. Галвестон, Университетский бульвар, д. 301

Мотин Владимир Леонидович. Профессор университета, Департамент патологии, Департамент микробиологии и иммунологии, канд. биол. наук.

Адрес для переписки: Федорова Валентина Анатольевна; feodorovav@mail.ru

Evaluation of diagnostic potential of immunoreactive epitopes of the Omptin protease family by using a peptide library

V. A. Feodorova^{1,2}, M. A. Khizhnyakova^{1,2}, S. S. Zaitsev¹, A. M. Lyapina¹,
L. V. Sayapina³, E. P. Lyapina⁴, O. V. Ulyanova¹, V. L. Motin⁵

¹ Federal Research Center for Virology and Microbiology (FRCVM) — Branch in Saratov,
53rd Strelkovoy Divizii street 6, Saratov 410028, Russian Federation

² Federal State-Funded Institution of Higher Professional Education
«Saratov State Agrarian University named after N. I. Vavilov»,
Teatralnaya Square 1, Saratov 410012, Russian Federation

³ 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

⁴ Federal State-Funded Institution of Higher Professional Education
«Saratov State Medical University named after N. I. Razumovsky»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Bolshaya Kazachya street 112, Saratov 410012, Russian Federation

⁵ University of Texas Medical Branch,
301 University Boulevard, Galveston, Texas 77555, USA

The construction of highly sensitive new-generation diagnostic test systems requires the use of modern innovative technologies that are capable of detecting infectious agents at the molecular level by identifying specific antibodies to individual immunoreactive epitopes. The development of such immunoassays is based on molecular mapping of a target antigen using a library of short overlapping peptides aimed at identification of both epitopes specific for a particular pathogen, and those common to the group of infectious agents. The article describes new approaches that are based on the results of mapping of the Omptin group model protein that could be critical for improving retrospective laboratory diagnosis of infectious diseases caused by bacteria of the *Enterobacteriaceae* family. The article discusses the prospects for assessing the applicability of the peptide ELISA experimental version, designated as p6/24-Omptin-TIFA, for the detection of antibodies to diagnostically significant Omptin epitopes in the serum of people who have had enterobacterial infections, in order to introduce it into healthcare practices.

Key words: laboratory diagnosis; peptide array; ELISA; Omptin; *Enterobacteriaceae*; retrospective diagnosis; immunoreactive epitope.

For citation: Feodorova VA, Khizhnyakova MA, Zaitsev SS, Lyapina AM, Sayapina LV, Lyapina EP, Ulyanova OV, Motin VL. Evaluation of diagnostic potential of immunoreactive epitopes of the Omptin protease family by using a peptide library. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(3): 180–186.

References

1. Zabokritskiy NA. The infectious morbidity in the Russian Federation and tendencies of it is development in the next decade. On-line Scientific & Educational Bulletin «Health and Education Millennium». 2015; 17(5): 16–26 (in Russian).
2. Rospotrebnadzor released statistics of infectious diseases for the first half of the year. Available from: <http://www.yaprivot.ru/news/2365/>.
3. Reineke U, Schutkowski M, eds. *Methods of Molecular Biology, Epitope Mapping Protocols*. Vol. 524. New York: Humana Press; 2009.
4. Hritonenko V, Stathopoulos C. Omptin proteins: an expanding family of outer membrane proteases in Gram-negative *Enterobacteriaceae*. *Mol Membr Biol*. 2007; 24(5–6): 395–406.
5. Kukkonen M, Korhonen TK. The Omptin family of enterobacterial surface proteases/adhesins: from housekeeping in *Escherichia coli* to systemic spread of *Yersinia pestis*. *Int J Med Microbiol*. 2004; 294(1): 7–14.
6. Haiko J, Suomalainen M, Ojala T, Lähteenmäki K, Korhonen TK. Invited review: Breaking barriers – attack on innate immune defences by Omptin surface proteases of enterobacterial pathogens. *Innate Immun*. 2009; 15(2): 67–80.
7. Brannon JR, Thomassin JL, Gruenheid S, Le Moual H. Antimicrobial peptide conformation as a structural determinant of Omptin protease specificity. *J Bacteriol*. 2015; 197(22): 3583–91.
8. Sodeinde OA, Subrahmanyam YV, Stark K, Quan T, Bao Y, Goguen JD. A surface protease and the invasive character of plague. *Science* 1992; 258(5084): 1004–7.
9. Kukleva LM, Boiko AV. Plasminogen activator — multifunctional protein of plague pathogen. *Problems of Particularly Dangerous Infections* 2016; 3: 13–20 (in Russian).
10. Korhonen TK, Haiko J, Laakkonen L, Järvinen HM, Westerlund-Wikström B. Fibrinolytic and coagulative activities of *Yersinia pestis*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013; 3: 35.
11. Evseeva VV, Platonov ME, Kopylov PKH, Dentovskaya SV, Anisimov AP. Plasminogen activator of *Yersinia pestis*. *Russian Journal of Infection and Immunity* 2015; 5(1): 27–36 (in Russian).
12. Easterbrook TJ, Reddin K, Robinson A, Modi N. Studies on the immunogenicity of the Pla protein from *Yersinia pestis*. *Contrib Microbiol Immunol*. 1995; 13: 214–5.
13. Benner GE, Andrews GP, Byrne WR, Strachan SD, Sample AK, Heath DG, et al. Immune response to *Yersinia* outer proteins and other *Yersinia pestis* antigens after experimental plague infection in mice. *Infect Immun*. 1999; 67(4): 1922–8.
14. Feodorova VA, Devdariani ZL. Development, characterisation and diagnostic application of monoclonal antibodies against *Yersinia pestis* fibrinolysin and coagulase. *J Med Microbiol*. 2000; 49(3): 261–9.
15. Braciale VL, Nash M, Sinha N, Zudina IV, Motin VL. Correlates of immunity elicited by live *Yersinia pestis* vaccine. In: Georgiev VS, Western K, McGowan JJ, eds. *National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH. Volume 1: Frontiers in Research*. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. P. 473–80.
16. Feodorova VA, Khizhnyakova MA, Lyapina AM, Zaitsev SS, Telepnev MV, Sayapina LV, et al. Murine and human early humoral immune responses to *Yersinia pestis* Pla antigen followed by immunization with live plague vaccine: Proceeding Book of the 12th International *Yersinia* Symposium. 2016, Oct. 25–28; Tbilisi; Georgia. P. 38.
17. *Yersinia pestis* CO92 plasmid pPCP1, complete sequence. NCBI Reference Sequence: NC_003132.1. Available from: <https://goo.gl/26Ag6J>.
18. Heuzenroeder MW, Barton MD, Vanniasinkam T, Phumoonna T. Linear B-cell epitope mapping using enzyme-linked immunosorbent

- assay for libraries of overlapping synthetic peptides. *Methods Mol Biol.* 2009; 524: 137–44.
19. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30(12): 2725–9.
20. Khizhnyakova MA, Feodorova VA, Zaitsev SS, Motin VL. The use of peptide microchips for epitope carting and immuno-diagnostics of infectious diseases. *Izvestia Orenburg State Agrarian University* 2013; 1 (39): 228–30 (in Russian).

Authors

Federal Research Center for Virology and Microbiology (FRCVM) — Branch in Saratov, 53rd Strelkovoy Divizii street 6, Saratov 410028, Russian Federation.

Feodorova VA. Chief research associate of the Laboratory of Molecular Biology and Nanobiotechnologies. Doctor of Medical Sciences, professor. Khizhnyakova MA. Junior research associate of the Laboratory of Molecular Biology and Nanobiotechnologies.

Zaitsev SS. Research associate of the Laboratory of Molecular Biology and Nanobiotechnologies.

Lyapina AM. Research associate of the Laboratory of Molecular Biology and Nanobiotechnologies.

Ulyanova OV. Senior research associate of the Laboratory of Molecular Biology and Nanobiotechnologies. Candidate of Medical Sciences, assistant professor.

Federal State-Funded Institution of Higher Professional Education

«Saratov State Agrarian University named after N. I. Vavilov», Teatralnaya Square 1, Saratov 410012, Russian Federation.

Feodorova VA. Professor of the Department of Microbiology, Biotechnology and Chemistry. Doctor of Medical Sciences, professor.

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.

Sayapina LV. Chief expert. Doctor of Medical Sciences.

Federal State-Funded Institution of Higher Professional Education «Saratov State Medical University named after N. I. Razumovsky» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Bolshaya Kazachya street 112, Saratov 410012, Russian Federation.

Lyapina EP. Professor of the Department of Infectious Diseases. Doctor of Medical Sciences.

University of Texas Medical Branch, 301 University Boulevard, Galveston, Texas 77555, USA

Motin VL. Professor of the Department of Pathological Conditions and the Department of Microbiology and Immunology. Candidate of Biological Sciences.

Contact e-mail: Feodorova Valentina Anatolyevna; feodorovav@mail.ru

Методические подходы к доклинической оценке побочного действия сывороточных иммунобиологических лекарственных препаратов

В. Н. Подкуйко¹, А. К. Яковлев², В. П. Краснянский¹, С. В. Борисевич¹, Н. К. Черникова¹,
Э. А. Яковлев¹, А. П. Пирожков¹, Д. Н. Лега¹, С. В. Назаров¹, Е. В. Гордеев¹, Я. В. Полянский¹,
Е. В. Рождественский¹, С. А. Нимирская¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«48 Центральный научно-исследовательский институт»
Министерства обороны Российской Федерации,
г. Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, д. 11

² 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 26.04.2017 г. Принята к публикации 04.07.2017 г.

Анализ методических подходов к доклиническому изучению сенсибилизирующей активности иммунобиологических препаратов из сыворотки крови лошадей показывает, что национальные руководящие документы рекомендуют использование ограниченной шкалы анафилактичности, которая не позволяет в полной мере прогнозировать безопасность клинического применения препаратов. Обоснован другой методический подход к доклинической оценке сенсибилизирующей активности сывороточных гетерологичных иммунобиологических препаратов по расчету сенсибилизирующей дозы, вызывающей анафилактическую реакцию у 50 % морских свинок, что позволит более объективно прогнозировать побочное действие как уже существующих, так и разрабатываемых гетерологичных иммуноглобулинов, а также индивидуально выбирать тактику их клинического применения.

Ключевые слова: сенсибилизирующая активность; сывороточные иммунобиологические лекарственные препараты; иммуноглобулины из сыворотки крови лошадей; анафилактичность; методический подход.

Библиографическое описание: Подкуйко ВН, Яковлев АК, Краснянский ВП, Борисевич СВ, Черникова НК, Пирожков АП, Яковлев ЭА, Пирожков АП, Лега ДН, Назаров СВ, Гордеев ЕВ, Полянский ЯВ, Рождественский ЕВ, Нимирская СА. Методические подходы к доклинической оценке побочного действия сывороточных иммунобиологических лекарственных препаратов. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(3): 187–192.

Сывороточные гетерологичные препараты как иммунобиологические лекарственные средства до сих пор не утратили своей значимости, особенно при защите людей от экзотических опасных и особо опасных инфекций [1–6]. Необходимым условием обращения иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) является минимальный риск развития их побочного действия. Одним из путей его снижения может быть индивидуальный подход к иммунопрофилактике и иммунотерапии [1]. Сенсибилизирующие (анафилактические) свойства сывороточных ИЛП являются основной причиной серьезных осложнений при серопротекции и терапии. Основными клиническими проявлениями антигенспецифической реакции организма на введение гетерологичных иммуноглобулинов являются анафилаксия и сывороточная болезнь, частота развития которой достигает 16 % [7]. Анафилаксия на введение гетерологичных сывороточных ИЛП — проявление иммунного ответа организма на чужеродный белок, представляющее угрозу для жизни и здоровья пациентов, поэтому в ряде случаев, в зависимости от аллергенного статуса человека, предусмотрено введение гетерологичных иммуноглобулинов под прикрытием десенсибилизирующей терапии [6, 8, 9]. Помимо уровня сенсибилизации пациента к белкам сыворотки крови лошади, частота и степень тяжести побочного действия сывороточного препа-

рата находятся в прямой зависимости от дозы и степени его очистки [1, 2].

При доклинических исследованиях сенсибилизирующую активность ИЛП оценивают по развитию гиперчувствительности немедленного типа (анафилактической реакции) у морских свинок. Учет интенсивности анафилактического шока проводят в индексах по формуле Вейглы (Weigle) [10]. Уровень аллергенных свойств, выявляемый при доклинической оценке сывороточных ИЛП, позволяет прогнозировать степень риска развития осложнений (сывороточной болезни, анафилактического шока и других аллергических реакций) при клиническом применении препаратов. Для снижения риска развития побочного действия сывороточных ИЛП необходим выбор схемы и тактики их применения на основе результатов доклинической оценки [1]. Однако национальные руководящие документы (РД) не дифференцируют препараты в зависимости от величины индекса Вейглы: в качестве критерия безвредности выдвигается единственное требование — препарат не должен вызывать смертельного анафилактического шока у морских свинок [10].

Целью работы является обоснование более объективной оценки сенсибилизирующей активности гетерологичных сывороточных ИЛП для обоснования безопасности эффективной дозы препарата.

Материалы и методы

В основу нового подхода положен метод оценки алергизирующего действия при доклиническом изучении ИЛП [10].

В работе использовали беспородных морских свинок обоих полов массой 200–250 г. Оценивали ИЛП из сыворотки крови лошадей против геморрагических лихорадок (Эбола, Ласса, Боливианская) и веноульсского энцефаломиелимита лошадей (ВЭЛ) производства ФГБУ 48 ЦНИИ [11–14] в сравнении с нормальной сывороткой крови лошади (положительный контроль — образец анафилактической активности), а также одним из трех выпускаемых в настоящее время или производимых ранее коммерческих лошадиных иммуноглобулинов против бешенства, клещевого или японского энцефалитов (препараты сравнения) [1, 15]. Иммуноглобулины и сыворотка крови лошадей содержали $(10 \pm 1) \%$ и $(7 \pm 1) \%$ белка соответственно. В качестве отрицательного контроля вводили 0,9 % раствор хлорида натрия. По истечению 2–4 недель воспроизводили анафилаксию путем внутривенного введения исследуемого иммуноглобулина в количестве $(0,1 \pm 0,01)$ мл. После разрешающей инъекции за морскими свинками наблюдали в течение 30 мин, фиксируя появление клинических симптомов анафилактической реакции. Клинические проявления анафилаксии учитывали раздельно в соответствии с методикой, изложенной в национальных руководящих документах, и вычисляли сенсibilизирующие дозы (SD_{50}), как указано в статье Н. М. Зубовичане с соавт. [10, 16]. Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами. Сенсibilизирующую дозу, вызывающую алергическую реакцию у 50 % морских свинок (SD_{50}), вычисляли по модифицированной формуле Кербера [17]:

$$\lg SD_{50} = \lg D_n - G (\Sigma L_i - 0,5),$$

где $\lg D_n$ — десятичный логарифм максимальной из испытанных доз, G — десятичный логарифм кратности испытанных разведений (в нашем случае равен 1), ΣL_i — сумма отношений числа животных, у которых развилась выраженная анафилактическая реакция от введения каждого из испытанных разведений препарата, к числу животных, которым эти разведения были введены (в $\lg$).

Результаты и обсуждение

Необходимость разработки нового подхода к оценке алергенных свойств сывороточных ИЛП была обусловлена анализом результатов их определения по РД [10]. В таблице 1 представлены результаты единичных определений индекса Вейгла для иммуноглобулинов из сыворотки крови лошадей. Его значения колеблются от 1,9 до 3,0 для иммуноглобулинов против геморрагических лихорадок и от 3,4 до 3,6 — для коммерческих сывороточных ИЛП. Средняя величина индекса Вейгла во второй группе в 1,3 раза больше, чем в первой и практически не отличается от показателя для лошадиной сыворотки крови. Поскольку относительная безопасность коммерческих препаратов доказана в ходе их клинического применения, данный факт указывает на несовершенство метода оценки сенсibilизирующих свойств по индексу Вейгла. Для его оптимизации необходимо либо расширить в шкале градацию признаков сенсibilизации в области максимальных степеней анафилаксии, либо перейти на способ определения доз препаратов, вызывающих клинически достоверные алергические реакции у 50 % животных. Исходя из цифровой индикации выраженности синдромов в крестах [10], доверительный интервал средней величины индекса разработанных в 48 ЦНИИ иммуноглобулинов (от 2,1 до 3,1) включает диапазон от ++ до +++, коммерческих препаратов (от 3,4 до 3,6) — от +++ до +++, а по двум группам (от 2,3 до 3,5) — от ++ до +++. Другими словами, с вероятностью 95 % достоверные реакции характеризуются указанной степенью выраженности, и шкала достоверной оценки по двум группам охватывает интервал от ++ до +++++.

Показатели средних величин индексов Вейгла при исследовании расширенного списка иммуноглобулинов (табл. 2) подтверждают выявленные закономерности. Анафилактогенность коммерческих гетерологичных иммуноглобулинов также в 1,3 раза выше, чем препаратов, разработанных в 48 ЦНИИ. Интервалы индексов Вейгла в обеих группах иммуноглобулинов, выраженные в крестах, колеблются от ++ до +++++. В целом из данных, представленных в таблицах 1 и 2, следует, что реакции со степенью клинической выраженности А (+) не входят в область достоверных значений при оценке уровня сенсibilизации обеих групп препаратов, а следовательно, их можно не учитывать в последующем при расчете SD_{50} .

Таблица 1. Изучение сенсibilизирующих свойств иммуноглобулинов из сыворотки крови лошадей на морских свинках

Препарат	Количество животных в группе с проявлениями реакции					Индекс Вэйгла (интервал) ¹		
	Д	А (+)	Б (++)	В (+++)	Г (++++)	И ²	$X_{cp} \pm J_{95}$	$X_{cp} \pm J_{95}$
Иммуноглобулин против геморрагических лихорадок	2	3	1	2	2	1,9	2,6±0,8 (от ++ до +++)	2,9±0,6 (от ++ до +++)
	1	1	2	3	3	2,6		
	0	1	2	3	4	3,0		
	0	1	2	3	4	3,0		
Иммуноглобулин против бешенства	0	0	2	2	6	3,4	3,5±0,2 (от +++ до +++)	
Иммуноглобулин против клещевого энцефалита	0	0	1	2	8	3,6		
Сыворотка крови лошади нормальная	0	0	0	0	8	4,0	—	—

Примечания. 1 — интервал указан в соответствии с цифровой индикацией клинической выраженности синдрома в крестах согласно [10]; 2 — И (индекс по РД) при единичном определении.

В серии опытов с использованием нового способа оценки сенсибилизирующих свойств (табл. 3) SD_{50} определяли для четырех пар исходных сывороток крови лошади и приготовленных на их основе иммуноглобулинов.

Для каждого препарата рассчитывали четыре величины SD_{50} с учетом в качестве минимальных реакции выраженностью +, ++, +++ или ++++ и всех последующих более сильных. Затем рассчитали средние этих величин и среднеквадратическое отклонение. В колонке справа представлены разницы между средними величинами и каждой из рассчитанных SD_{50} по каждой серии препаратов; показан минимальный уровень выраженности реакций, при учете которых вкупе с более сильными величина SD_{50} менее всего отличается от среднего значения. Из данных, представленных в таблице 3, видно, что такие реакции характеризуются выраженностью ++ или +++. Вместе с тем, наибольшие различия аллергенных свойств между сывороткой крови и иммуноглобулином в каждой паре выявлены при подсчете SD_{50} , начиная с реакций выраженностью ++. Они составили от 1,0 до 1,8lg. В этом случае способ испытаний показал себя как наиболее дифференцирующий.

Таким образом, на основании проведенного исследования обоснован способ расчета SD_{50} , вызывающий у 50 % животных реакции выраженностью ++ и более. Предложенный способ после прохождения апробации в ходе

доклинических исследований ИЛП позволит более точно установить безопасную дозу сывороточного препарата и обеспечить индивидуальный подход к серопротекции и терапии. Результаты количественного определения сенсибилизирующей активности гетерологичных ИЛП по SD_{50} указывают на точность определения их сенсибилизирующих свойств по клинически достоверным степеням анафилактической реакции Б (++) , В (+++) и Г (++++) и дифференцирование свойств препаратов, характеризующихся высокой анафилактогенностью. Безопасность клинического применения иммуноглобулина Эбола [8, 9] подтвердила прогностическую ценность нового подхода к доклинической оценке побочного действия ИЛП из сыворотки крови лошадей.

Выводы

1. Анализ методических подходов к доклиническому изучению сенсибилизирующей активности ИЛП из сыворотки крови лошадей показывает, что национальные РД рекомендуют использование для этих целей ограниченной шкалы анафилактогенности, которая в области высоких степеней неопределенна и не позволяет в полной мере прогнозировать безопасность клинического применения препаратов.

Таблица 2. Выраженность анафилаксии у морских свинок при изучении иммуноглобулинов из сыворотки крови лошадей, разработанных в 48 ЦНИИ, и коммерческих препаратов

ИЛП из сыворотки крови лошадей			Анафилактогенность		
Группа	Иммуноглобулины против ... или сыворотка		Индекс Вейгла, $X_{cp} \pm \delta$ (интервал в крестах) ¹		
Испытуемые (48 ЦНИИ)	геморрагических лихорадок	Эбола	2,5±0,5 (от ++ до +++)	2,7±0,3 (от ++ до +++)	3,2±0,5 (от +++ до ++++)
		Боливийская	2,5±0,6 (от ++ до +++)		
		Ласса	3,1±0,4 (от +++ до ++++)		
	венесуэльского энцефаломиелита лошадей		3,1±0,7 (от ++ до ++++)		
Коммерческие	японского энцефалита		3,7±0,7 (от +++ до ++++)	3,6±0,2 (от +++ до ++++)	
	клещевого энцефалита		3,6±0,7 (от +++ до ++++)		
	бешенства		3,4±0,8 (от +++ до ++++)		
Контроль	Сыворотка крови лошадей		4,0 (++++)	—	—

Примечание. 1 — интервал представлен в соответствии с цифровой индикацией клинической выраженности синдрома в крестах, согласно [10].

Таблица 3. Результаты исследований сенсибилизирующей активности ИЛП из сыворотки крови лошадей с расчетом сенсибилизирующей дозы (SD_{50})

Препарат		Сенсибилизирующая активность с учетом реакций выраженностью ... и более, lg SD_{50} /мл $X_{cp} \pm \sigma$				Средняя SD_{50} , lg $X_{cp} \pm \sigma$	Разница между средней и каждой из рассчитанных SD_{50} , lg				Выраженность реакции при min разнице ¹
вид	серия	+	++	+++	++++		+	++	+++	++++	
Сыворотка крови	1	6,5±0,4	6,0±0,2	5,7±0,3	5,0±0,4	5,8±0,6	-0,7	-0,2	-0,1	0,8	+++
	2	5,5±0,2	5,3±0,2	4,5±0,4	3,0±0,3	4,6±1,1	-1,1	-0,7	-0,1	1,6	+++
	3	5,8±0,4	4,5±0	3,3±0,4	3,3±0,4	4,2±1,2	-1,6	-0,3	0,9	0,9	++
	4	5,0±0,2	4,5±0,3	3,5±0,4	3,3±0,4	4,0±0,9	-1,0	-0,5	0,5	1,0	++/+++
Иммуноглобулин	1	5,3±0,4	4,8±0,5	4,8±0,5	4,5±0,5	4,9±0,3	-0,4	0,1	0,1	0,4	++/+++
	2	4,5±0,3	3,5±0,3	3,0±0,2	2,5±0,3	3,4±0,9	-1,1	-0,1	0,4	0,9	++
	3	4,7±0,3	3,3±0,4	2,7±0,3	2,0±0,3	3,2±1,1	-0,9	-0,1	0,5	1,2	++
	4	4,5±0,5	3,5±0,4	3,5±0,4	3,0±0,4	3,7±0,5	-0,8	0,2	0,2	0,7	++/+++

Примечание. 1 — Разница между средней SD_{50} и SD_{50} при учете реакций, начиная с указанной степени выраженности, минимальна по сравнению с остальными.

2. Определение дозы гетерологичных сывороточных ИЛП, вызывающей анафилактическую реакцию у 50 % морских свинок, начиная с минимально достоверного проявления тяжести Б (++), позволяет более точно количественно оценить их аллергенные свойства.

3. Предложенный метод оценки перспективен для адекватного прогнозирования безопасности для людей вновь разрабатываемых гетерологичных иммуноглобулинов и уже существующих препаратов из сыворотки крови животных при совершенствовании технологии их получения, а также для выработки индивидуальной тактики их клинического применения.

Литература

1. Медуницын НВ, Миронов АН, Мовсенянц АА. Теория и практика вакцинологии. М.: Ремедиум; 2015.
2. Пенъевская НА, Рудаков НВ. Эффективность применения препаратов иммуноглобулина для постэкспозиционной профилактики клещевого энцефалита в России (обзор полувекского опыта). Медицинская паразитология и паразитарные болезни 2010; (1): 53–9.
3. Борисевич ИВ, Потрываева НВ, Мельников СА, Евсеев АА, Краснянский ВП, Максимов ВА. Получение иммуноглобулина к вирусу Марбург на основе сыворотки крови лошадей. Вопросы вирусологии 2008; 53(1): 39–41.
4. Краснянский ВП, Михайлов ВВ, Борисевич ИВ, Потрываева НВ, Мельников СА, Тиманькова ГД. Препарат, содержащий иммуноглобулин против лихорадки Марбург из сыворотки крови лошадей жидкий (иммуноглобулин лошадиный Марбург). Патент Российской Федерации (RU) № 2257916; 2003.
5. Pyankov OV, Setoh YX, Bodnev SA, Edmonds JH, Pyankova OG, Pyankov SA, et al. Successful post-exposure prophylaxis of Ebola infected non-human primates using Ebola glycoprotein-specific equine Ig G. Scientific reports 2017. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep41537>.
6. Zheng X, Wong G, Zhao Y, Wang H, He Sh, Bi Y, et al. Treatment with hyperimmune equine immunoglobulin or immunoglobulin fragments completely protects rodents from Ebola virus infection. Scientific reports 2016. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep24179>.
7. Сняк КМ, Жарко ТР, Вернер ОМ. Пособие по медицинским иммунобиологическим препаратам. Киев: 1992.
8. Хмелев АЛ, Борисевич ИВ, Черникова НК, Махлай АА, Михайлов ВВ, Яковлев АК и др. Оценка безопасности профилактики
- ческого использования иммуноглобулинов против вирусных геморрагических лихорадок из сывороток крови лошадей. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии 2012; (6): 103–6.
9. Борисевич ИВ, Черникова НК, Марков ВИ, Краснянский ВП, Борисевич СВ, Рождественский ЕВ. Опыт клинического применения специфического иммуноглобулина из сыворотки крови лошадей в качестве средства экстренной профилактики лихорадки Эбола. Вопросы вирусологии 2017; (1): 25–9.
10. Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая. М.: Гриф и К; 2012. С. 235–6.
11. Краснянский ВП, Градобоев ВН, Борисевич ИВ, Потрываева НВ, Лебединская ЕВ, Черникова НК, Тиманькова ГД. Разработка и изучение свойств иммуноглобулина против лихорадки Ласса. Вопросы вирусологии 1997; 42(4): 168 – 71.
12. Краснянский ВП, Михайлов ВВ, Лукин ЕН, Борисевич ИВ, Потрываева НВ, Мельников СА и др. Препарат, содержащий иммуноглобулин против венозного энцефаломиелимита лошадей из сыворотки крови лошадей жидкий (иммуноглобулин лошадиный ВЭЛ): Патент Российской Федерации (RU) № 2261113; 2003.
13. Михайлов ВВ, Борисевич ИВ, Тиманькова ГД, Краснянский ВП, Потрываева НВ, Лебединская ЕВ, Черникова НК. Препарат, содержащий иммуноглобулин против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей, жидкий (иммуноглобулин Эбола): Патент Российской Федерации (RU) № 2130318; 1996.
14. Хмелев АЛ, Пантюхов ВВ, Сыромятникова СИ, Потрываева НВ, Мельников СА, Пирожков АП, и др. Препарат, содержащий иммуноглобулин против Боливийской геморрагической лихорадки из сыворотки крови лошадей, раствор для внутримышечного введения. Патент Российской Федерации (RU) № 2342952; 2007.
15. Медицинские иммунобиологические препараты. Т. 2. Иммуноглобулины человека, сыворотки, иммуноглобулины гетерологичные, моноклональные антитела, пробиотики, бактериофаги, аллергены, цитокины (вводимые людям). М.: Гелла-Принт; 2011.
16. Зубовичане НМ, Дедкова ЛМ, Сергеев НН, Офицеров ВИ. Сенсибилизирующие и вируснейтрализующие свойства козьих иммуноглобулинов против вируса Эбола. Вопросы вирусологии 2002; (2): 45–8.
17. Ашмарин ИП, Воробьев АА. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.; 1962.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, г. Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, д. 11.

Подкуйко Валерий Николаевич. Ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник.

Краснянский Владимир Павлович. Ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник.

Борисевич Сергей Владимирович. Начальник ФГБУ, доктор биологических наук, профессор.

Черникова Наталья Константиновна. Старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник.

Яковлев Эдуард Андреевич. Руководитель группы научно-исследовательского отдела, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник.

Пирожков Алексей Петрович. Ведущий научный сотрудник Управления, кандидат медицинских наук

Лега Дмитрий Николаевич. Младший научный сотрудник научно-исследовательского отдела.

Назаров Станислав Викторович. Старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела.

Гордеев Евгений Васильевич. Заместитель начальника научно-исследовательского отдела.

Полянский Ярослав Владимирович. Старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела.

Рождественский Евгений Всеволодович. Начальник научно-исследовательского отдела, кандидат биологических наук.

Нимирская Светлана Александровна. Научный сотрудник научно-исследовательского отдела, кандидат биологических наук.

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

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

Адрес для переписки: Борисевич Сергей Владимирович; cnii@mail.ru

Methodological approaches to preclinical evaluation of immunobiological serum products and their side effects

V. N. Podkuyko¹, A. K. Yakovlev², V. P. Krasnyansky¹, S. V. Borisevich¹, N. K. Chernikova¹, E. A. Yakovlev¹, A. P. Pirozhkov¹, D. N. Lega¹, S. V. Nazarov¹, E. V. Gordeev¹, Ya. V. Polyansky¹, E. V. Rozhdestvensky¹, S. A. Nimirskaya¹

¹ The 48th Central Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation,

11 Otyabrskaya street, Sergiev Posad-6, Russian Federation

² 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

Analysis of methodological approaches to preclinical evaluation of sensitizing activity of horse serum products shows that the anaphylactogenicity scale recommended in national regulatory documents is imperfect as it is not capable of fully predicting the safety of the clinical use of products. The article demonstrates feasibility of another methodological approach to preclinical evaluation of sensitizing activity of heterologous serum products which is based on calculation of a sensitizing dose inducing anaphylactic reactions in 50 % of guinea pigs. This approach will make it possible to more effectively predict side effects of already authorized heterologous immunoglobulins and drugs currently under development, and to select a clinical use strategy on a case-by-case basis.

Key words: sensitizing activity; immunobiological serum products; horse serum immunoglobulins; anaphylactogenicity; methodological approach.

For citation: Podkuyko VN, Yakovlev AK, Krasnyansky VP, Borisevich SV, Chernikova NK, Yakovlev EA, Pirozhkov AP, Lega DN, Nazarov SV, Gordeev EV, Polyansky YaV, Rozhdestvensky EV, Nimirskaya SA. Methodological approaches to preclinical evaluation of immunobiological serum products and their side effects. *BIOPreparation. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(3): 187–192.

References

1. Medunitsyn NV, Mironov AN, Movsesyants AA. Theory and practice of vaccinology. Moscow: Remedium; 2015 (in Russian).
2. Penyevskaya NA, Rudakov NV. The effectiveness of immunoglobulin preparations for post-exposure prophylaxis of tick-borne encephalitis in Russia (Review a half-century of experience). *Medical Parasitology and Parasitic Diseases* 2010; (1): 53–9 (in Russian).
3. Borisevich IV, Potryvaeva NV, Melnikov SA, Yevseyev AA, Krasnyansky VP, Maksimov VA. Design of equine serum-based Marburg virus immunoglobulin. *Voprosy virusologii* 2008; 53(1): 39–41 (in Russian).
4. Krasnyansky VP, Mikhaylov VV, Borisevich IV, Potryvaeva NV, Melnikov SA, Timankova GD. Liquid preparation containing immunoglobulin efficient against Marburg fever from horse blood serum (horse immunoglobulin Marburg). Patent RUS. 2257916 04. 12.2003 (in Russian).
5. Pyankov OV, Setoh YX, Bodnev SA, Edmonds JH, Pyankova OG, Pyankov SA, et al. Successful post-exposure prophylaxis of Ebola infected non-human primates using Ebola glycoprotein-specific equine Ig G. *Scientific reports* 2017. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep41537>.
6. Zheng X, Wong G, Zhao Y, Wang H, He Sh, Bi Y, et al. Treatment with hyperimmune equine immunoglobulin or immunoglobulin fragments completely protects rodents from Ebola virus infection. *Scientific reports* 2016. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep24179>.
7. Synyak KM, Zharko TR, Werner OM. Guidebook on medical immunobiological drugs. Kiev: 1992 (in Russian).
8. Khmelev AL, Borisevich IV, Chernikova NK, Makhlay AA, Mikhaylov VV, Yakovlev AK, et al. Evaluation of safety of prophylactic use of immunoglobulins against viral hemorrhagic fevers from horse blood sera. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology* 2012; (6): 103–6 (in Russian).
9. Borisevich IV, Chernikova NK, Markov VI, Krasnyanskiy VP, Borisevich SV, Rozhdestvenskiy EV. An experience in the clinical use of specific immunoglobulin from horse blood serum for prophylaxis of Ebola haemorrhagic fever. *Voprosy virusologii* 2017; 62(1): 25–9 (in Russian).
10. Mironov AN, ed. Guidelines for preclinical studies of medicines (immunobiological medicines). Part 2. Moscow: Grifi K; 2012. P. 235–6 (in Russian).
11. Krasnyansky VP, Gradoboev VN, Borisevich IV, Potryvaeva NV, Lebedinskaya EV, Chernikova NK, Timankova GD. Development and study of the properties of immunoglobulin against Lassa fever. *Voprosy virusologii* 1997; 42(4): 168–71 (in Russian).
12. Krasnyansky VP, Mikhaylov VV, Lukin EP, Borisevich IV, Potryvaeva NV, Melnikov SA, et al. The preparation containing immunoglobulin against VEE from horse blood serum liquid (immunoglobulin against VEE from horse blood serum). Patent RUS 2261113 04.12.2003 (in Russian).
13. Mikhaylov VV, Borisevich IV, Timankova GD, Krasnyansky VP, Potryvaeva NV, Lebedinskaya EV, Chernikova NK. The preparation containing immunoglobulin against Ebola fever from horse blood serum liquid (immunoglobulin Ebola). Patent RUS 2130318 05.07.1996 (in Russian).
14. Khmelev AL, Pantukhov VB, Syromyatnikova SI, Potryvaeva NV, Melnikov SA, Pirozhkov AP, et al. The preparation containing immunoglobulin against Bolivian hemorrhagic fever from horse blood serum, intramuscular solution. Patent of the Russian Federation № 2342952; 2007 (in Russian).
15. Medical immunobiological preparations. V. 2. Human immunoglobulins, sera, heterologous immunoglobulins, monoclonal antibodies, probiotics, bacteriophages, allergens, cytokines (administered to humans). Moscow: Gella-Print; 2011 (in Russian).
16. Zubavichene NM, Dedkova LM, Sergeev NN, Ofitserov VI. Sensitizing and virus-neutralizing characteristics of goat immunoglobulins to Ebola virus. *Voprosy virusologii* 2002; 47(2): 45–8 (in Russian).
17. Ashmarin IP, Vorobyev AA. Statistical methods in microbiological studies. Leningrad; 1962 (in Russian).

Authors

The 48th Central Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation, 11 Otyabrskaya street, Sergiev Posad-6, Russian Federation.

Podkuyko VN. Leading research associate of the Research Department. Doctor of Medical Sciences, senior research fellow.

Krasnyansky VP. Leading research associate of the Research Department. Candidate of Medical Sciences, senior research fellow.

Borisevich SV. Director. Doctor of Biological Sciences, professor.

Chernikova NK. Senior research associate of the Research Department. Candidate of Biological Sciences, senior research fellow.

Yakovlev EA. Team leader at the Research Department. Candidate of Medical Sciences, senior research fellow.

Pirozhkov AP. Leading research associate of the Directorate. Candidate of Medical Sciences.

Lega DN. Junior research associate of the Research Department.

Nazarov SV. Senior research associate of the Research Department.

Gordeev EV. Deputy head of the Research Department.

Polyansky YaV. Senior research associate of the Research Department.

Rozhdestvensky EV. Head of the Research Department.

Nimirskaia SA. Research associate of the Research Department.

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.

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

Contact e-mail: *Borisevich Sergei Vladimirovich;* cnii@mail.ru



**ТАТЬЯНА ИВАНОВНА
НЕМИРОВСКАЯ**
(к 70-летию со дня рождения)

**TATYANA IVANOVNA
NEMIROVSKAYA**
(on the 70th anniversary)

7 сентября 2017 года исполнилось 70 лет начальнику лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России кандидату медицинских наук Немировской Татьяне Ивановне.

Татьяна Ивановна родилась в г. Томск в 1947 г. В 1965 г. поступила в 1-й Московский медицинский институт им. И. М. Сеченова. В 1971 г. окончила по специальности «Медико-санитарное дело».

После окончания института была принята на должность младшего научного сотрудника отдела микробиологии Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского, где занималась изучением дисбактериоза кишечника.

В 1974 г. поступила в очную аспирантуру при ГИСК им. Л. А. Тарасевича. В 1978 г. защитила диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности «Микробиология» на тему «Биологиче-

ские характеристики и серологические особенности непатогенных видов нейссерий».

После окончания аспирантуры работала в ГИСК им. Л. А. Тарасевича в должности старшего научного сотрудника в лаборатории бактериологических питательных сред, затем в лаборатории бактериальных вакцин и пробиотиков, где занималась вопросами стандартизации и контроля полисахаридных и конъюгированных вакцин.

В апреле 2011 г. после реорганизации ГИСК им. Л. А. Тарасевича в форме присоединения к ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России была назначена на должность начальника лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Т. И. Немировская лично и в соавторстве опубликовала более 80 научных трудов, имеет патент на изобретение, награждена знаком «Отличник здравоохранения», медалью «В память 850-летия Москвы».



ИЛЬЯ ВЛАДИМИРОВИЧ ДАРМОВ (к 65-летию со дня рождения)

ILYA VLADIMIROVICH DARMOV (on the 65th anniversary)

2 августа 2017 года исполнилось 65 лет доктору медицинских наук, профессору, главному научному сотруднику научно-исследовательского управления филиала ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России (г. Киров) Илье Владимировичу Дармову.

И. В. Дармов родился в 1952 г. в городе Куйбышеве. После окончания в 1975 году медико-биологического факультета 2-го Московского государственного медицинского института имени Н. И. Пирогова по специальности «Врач-биофизик» был призван в ряды Советской Армии и направлен для прохождения службы в НИИ микробиологии МО СССР (г. Киров), где прошел все ступени служебной лестницы от младшего научного сотрудника до начальника института, полковника медицинской службы.

В 1976–1978 гг. совместно с Т. Г. Абдуллиным и Е. В. Смирновым выполнил цикл экспериментальных исследований собственных плазмид у чумного микроба, которые были признаны научным открытием (диплом на открытие Госкомитета СССР за № 001 «Плазма»; приоритет от 27 декабря 1977 г.). В 1981 г. защитил кандидатскую диссертацию, в 1990 г. — докторскую. В 1997 г. ему присвоено ученое звание профессора по кафедре биологии.

В период с 1997 по 2009 гг. И. В. Дармов руководил научно-исследовательской деятельностью в ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России, являясь заместителем начальника института по научной работе. Под его руководством и при непосредственном участии были разработаны и прошли государственные испытания новые вакцинные препараты, диагностикумы и тест-системы для выявления и идентификации ряда возбудителей особо опасных инфекций бактериальной природы с помощью молекулярно-генетических и иммунологических методов, налажено их производство.

В 2003 году за разработку и внедрение в медицинскую практику новых средств специфической профилактики

ки, диагностики и лечения сибирской язвы И. В. Дармову в составе авторского коллектива присуждена Государственная премия Российской Федерации в области науки и техники.

С 2010 по 2012 гг. И. В. Дармов был начальником ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России (г. Киров). С 2012 года работает в институте главным научным сотрудником.

Много внимания И. В. Дармов уделяет подготовке дипломированных специалистов. Под его руководством защищено 24 диссертации, в том числе 12 докторских. С 2000 по 2010 гг. руководил диссертационным советом по проблемам биологической защиты, с 2015 года является заместителем председателя диссертационного совета.

Область научных интересов И. В. Дармова — генетика бактерий, микробиология и прикладная иммунология. И. В. Дармов лично и в соавторстве опубликовал более 250 научных трудов, является автором (соавтором) 2 научных открытий и 46 изобретений.

Работая в составе комиссии Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации, принял участие в разработке ряда нормативно-методических документов федерального уровня. Службу и работу в ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России совмещает с преподавательской деятельностью в Вятском государственном университете. Возглавляемая им с момента создания в 1995 г. и по настоящее время кафедра микробиологии подготовила и выпустила около 400 квалифицированных биотехнологов и микробиологов.

За заслуги перед Отечеством, организацию научно-исследовательской работы и подготовку научных кадров И. В. Дармов награжден орденом Почета и медалями.

