

ISSN 2221-996X (Print)  
ISSN 2619-1156 (Online)

# БИО ПРЕПАРАТЫ

## ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

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

Том 18, № **3**  
Июль – сентябрь 2018



### В НОМЕРЕ

Редактирование генома и биомедицинские клеточные продукты:  
современное состояние, безопасность и эффективность

Методические подходы к валидации технологических процессов  
получения терапевтических рекомбинатных белков  
на основе концепции «Quality by Design»

ISSN 2221-996X



9 772221 1996004

Включен в наукометрическую базу данных Science Index  
on-line версия журнала [www.biopreparations.ru](http://www.biopreparations.ru)

Журнал индексируется в базе данных  
«Российский индекс научного цитирования» (РИНЦ).  
Пятилетний импакт-фактор РИНЦ — 0,462  
(без самоцитирования).

Архив журнала размещен в общероссийской базе  
научных публикаций «КиберЛенинка»,  
научной информационной системе «Соционет»,  
Российской государственной библиотеке,  
Академии Google (Google Scholar),  
каталоге Национальной Медицинской  
Библиотеки США (NLM Catalog).

К публикации принимаются  
только статьи, подготовленные в соответствии  
с правилами для авторов, размещенными  
на сайте журнала (<http://www.biopreparations.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.

Материалы заочных конференций не публикуются.  
Журнал выходит 4 раза в год.

ISSN 2221-996X (Print)  
ISSN 2619-1156 (Online)

**БИО** ПРЕПАРАТЫ

---

**ПРОФИЛАКТИКА,  
ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ**

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

Том 18, № 3  
Июль – сентябрь 2018

**BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie**  
**[BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]**

Peer-reviewed scientific and practical journal of  
Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products

Volume 18, No. 3  
July – September 2018

«БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» — журнал ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Создан в 2001 г. как периодическое научное издание Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А. Тарасевича. В журнале рассматриваются вопросы разработки, стандартизации, контроля качества, производства и применения медицинских биологических препаратов и биомедицинских клеточных продуктов, а также диагностики инфекционных, аллергических и иммунопатологических процессов.

В журнале публикуются обзорные и оригинальные статьи, область исследований которых соответствует **медицинской и биологической отраслям науки** и следующим группам специальностей: **03.01.00 Физико-химическая биология, 14.01.00 Клиническая медицина, 14.03.00 Медико-биологические науки.**



*Л. А. Тарасевич*

## ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

**Олефир Юрий Витальевич**, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник (Москва, Россия)

## ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

**Меркулов Вадим Анатольевич**, доктор медицинских наук, профессор (Москва, Россия)

**Бондарев Владимир Петрович**, доктор медицинских наук, профессор (Москва, Россия)

### РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

**Авдеева Жанна Ильдаровна**, доктор медицинских наук, профессор (Москва, Россия)

**Амвросьева Тамара Васильевна**, доктор медицинских наук, профессор (Минск, Республика Беларусь)

**Бакулин Михаил Константинович**, доктор медицинских наук, профессор (Киров, Россия)

**Борисевич Игорь Владимирович**, доктор медицинских наук, профессор (Москва, Россия)

**Волчков Виктор Евгеньевич**, доктор медицинских наук, профессор (Лион, Франция)

**Воробьева Мая Сергеевна**, доктор медицинских наук, профессор (Москва, Россия)

**Дармов Илья Владимирович**, доктор медицинских наук, профессор (Киров, Россия)

**Дегтярев Сергей Харитонович**, доктор биологических наук, профессор (Новосибирск, Россия)

**Иванов Вячеслав Борисович**, доктор медицинских наук, профессор (Москва, Россия)

**Игнатьев Георгий Михайлович**, доктор медицинских наук, профессор (Москва, Россия)

**Леви Диана Тимофеевна**, доктор медицинских наук, профессор (Москва, Россия)

**Мовсесянц Арташес Авакович**, доктор медицинских наук, профессор (Москва, Россия)

**Мосягин Вячеслав Дмитриевич**, доктор медицинских наук, профессор (Москва, Россия)

**Пащенко Юрий Иванович**, доктор биологических наук, профессор (Сергиев Посад, Московская область, Россия)

**Хамитов Равиль Авгатович**, доктор медицинских наук, профессор (Вольгинский, Владимирская область, Россия)

**Чумаков Константин Михайлович**, доктор биологических наук (Силвер-Спринг, Мэриленд, США)

### ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

**Климов Владимир Иванович**, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник (Москва, Россия)

### РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

**Борисевич Сергей Владимирович**, доктор биологических наук, профессор, член-корр. РАН

(Сергиев Посад, Московская область, Россия)

**Брико Николай Иванович**, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

**Гинцбург Александр Леонидович**, доктор биологических наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

**Дятлов Иван Алексеевич**, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

(Оболensk, Московская область, Россия)

**Зверев Виталий Васильевич**, доктор биологических наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

**Кутырев Владимир Викторович**, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН (Саратов, Россия)

**Львов Дмитрий Константинович**, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

**Медуницын Николай Васильевич**, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

**Михайлов Михаил Иванович**, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)

**Покровский Валентин Иванович**, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

**Савченко Валерий Григорьевич**, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

**Учайкин Василий Федорович**, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

**Хаитов Рахим Мусаевич**, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

### НАУЧНЫЕ РЕДАКТОРЫ

**Гойкалова Ольга Юрьевна**, кандидат биологических наук, доцент (Москва, Россия)

**Лебединская Елена Владимировна**, кандидат биологических наук (Москва, Россия)

### РЕДАКТОР

**Шестакова Алина Павловна** (Москва, Россия)

Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie [BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment] — a journal of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia. It was established in 2001 as a scientific journal of the L.A. Tarasevich State Scientific Research Institute for Standardization and Control of Biological Medicinal Products. It covers such issues as development, standardization, quality control, production and use of medicinal biological products and biomedical cell products, as well as diagnosis of infectious, allergic and immunopathological processes.

The journal publishes review papers and research articles pertaining to **biological and medical areas of research** and one of the following specialist fields: **03.01.00 Physicochemical Biology, 14.01.00 Clinical Medicine, 14.03.00 Medical and Life Sciences.**

#### EDITOR-IN-CHIEF

**Yuri V. Olefir**, Doctor of Medical Sciences, Senior Research Associate (Moscow, Russia)

#### DEPUTY EDITORS-IN-CHIEF

**Vadim A. Merkulov**, Doctor of Medical Sciences, Professor (Moscow, Russia)

**Vladimir P. Bondarev**, Doctor of Medical Sciences, Professor (Moscow, Russia)

#### EDITORIAL BOARD

**Zhanna I. Avdeeva**, Doctor of Medical Sciences, Professor (Moscow, Russia)

**Tamara V. Amvroseyeva**, Doctor of Medical Sciences, Professor (Minsk, Republic of Belarus)

**Mikhail K. Bakulin**, Doctor of Medical Sciences, Professor (Kirov, Russia)

**Igor V. Borisevich**, Doctor of Medical Sciences, Professor (Moscow, Russia)

**Viktor E. Volchkov**, Doctor of Medical Sciences, Professor (Lyon, France)

**Maya S. Vorobieva**, Doctor of Medical Sciences, Professor (Moscow, Russia)

**Ilya V. Darmov**, Doctor of Medical Sciences, Professor (Kirov, Russia)

**Sergey Kh. Degtyarev**, Doctor of Biological Sciences, Professor (Novosibirsk, Russia)

**Vyacheslav B. Ivanov**, Doctor of Medical Sciences, Professor (Moscow, Russia)

**Georgy M. Ignatyev**, Doctor of Medical Sciences, Professor (Moscow, Russia)

**Diana T. Levi**, Doctor of Medical Sciences, Professor (Moscow, Russia)

**Artashes A. Movsesyants**, Doctor of Medical Sciences, Professor (Moscow, Russia)

**Vyacheslav D. Mosyagin**, Doctor of Medical Sciences, Professor (Moscow, Russia)

**Yuri I. Pashchenko**, Doctor of Biological Sciences, Professor (Sergiev Posad, Moscow Region, Russia)

**Ravil A. Khamitov**, Doctor of Medical Sciences, Professor (Volginsky, Vladimir Region, Russia)

**Konstantin M. Chumakov**, Doctor of Biological Sciences (Silver Spring, Maryland, USA)

#### EXECUTIVE EDITOR

**Vladimir I. Klimov**, Candidate of Medical Sciences, Senior Research Associate (Moscow, Russia)

#### EDITORIAL COUNCIL

**Sergey V. Borisevich**, Doctor of Biological Sciences, Professor, Corresponding Member of the RAS (Sergiev Posad, Moscow Region, Russia)

**Nikolay I. Briko**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the RAS (Moscow, Russia)

**Aleksandr L. Gintsburg**, Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of the RAS (Moscow, Russia)

**Ivan A. Dyatlov**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the RAS (Obolensk, Moscow Region, Russia)

**Vitaly V. Zverev**, Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of the RAS (Moscow, Russia)

**Vladimir V. Kutyrev**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the RAS (Saratov, Russia)

**Dmitry K. Lvov**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the RAS (Moscow, Russia)

**Nikolay V. Medunitsyn**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the RAS (Moscow, Russia)

**Mikhail I. Mikhaylov**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the RAS (Moscow, Russia)

**Valentin I. Pokrovsky**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the RAS (Moscow, Russia)

**Valery G. Savchenko**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the RAS (Moscow, Russia)

**Vasily F. Uchaykin**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the RAS (Moscow, Russia)

**Rakhim M. Khaitov**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the RAS (Moscow, Russia)

#### SCIENCE EDITORS

**Olga Yu. Goykalova**, Candidate of Biological Sciences, Assistant Professor (Moscow, Russia)

**Elena V. Lebedinskaya**, Candidate of Biological Sciences (Moscow, Russia)

#### EDITOR

**Alina P. Shestakova** (Moscow, Russia)

## ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Рецензируемый научно-практический журнал

### СОДЕРЖАНИЕ

#### Обзоры

- Редактирование генома и биомедицинские клеточные продукты: современное состояние, безопасность и эффективность**  
А. А. Горяев, М. В. Савкина, К. М. Мефед, В. П. Бондарев, В. А. Меркулов, В. В. Тарасов . . . . . 140
- Международный опыт нормативно-правового регулирования препаратов, содержащих жизнеспособные клетки человека**  
Е. В. Мельникова, А. А. Горяев, М. В. Савкина, О. В. Меркулова, А. А. Чапленко, О. А. Рачинская, И. С. Семенова, Г. А. Трусов, В. А. Меркулов . . . . . 150
- Свиной трипсин в производстве биологических лекарственных препаратов. Риски и требования к безопасности**  
С. М. Суханова, Е. М. Петручук . . . . . 161
- Рекомендации по изложению методики оценки биологической (специфической) активности биотехнологических лекарственных препаратов в нормативной документации**  
О. В. Головинская, С. Л. Лысыкова, Ю. Н. Лебедева, Н. А. Алпатова, А. А. Мовсесянц, В. А. Меркулов . . . . . 168

#### Оригинальные статьи

- Методические подходы к валидации технологических процессов получения терапевтических рекомбинантных белков на основе концепции «Quality by Design»**  
Н. В. Стратонова, А. С. Лисов, А. Н. Морозов, Д. В. Тюпа, Р. А. Хамитов . . . . . 175
- Подходы к фармацевтическому анализу современных пептидных и олигонуклеотидных препаратов на примере инновационного препарата на основе малой интерферирующей РНК для лечения бронхиальной астмы**  
Л. М. Красных, В. В. Смирнов, Г. В. Раменская, Г. Ф. Василенко, И. П. Шиловский, М. Р. Хаитов . . . . . 184
- «Микробиологическая чистота» сухих питательных сред, используемых для оценки стерильности иммунобиологических лекарственных препаратов**  
С. М. Суханова, Н. Е. Захарова . . . . . 191

#### Хроника

- Михаил Константинович Бакулин (к 65-летию со дня рождения)** . . . . . 198
- Владимир Александрович Шевцов (к 60-летию со дня рождения)** . . . . . 199
- Памяти Ирины Григорьевны Осиповой** . . . . . 200
- Памяти Лидии Григорьевны Карпович** . . . . . 201
- Памяти Наталии Ивановны Лонской** . . . . . 202

Свидетельство о регистрации средства массовой информации:  
ПИ № ФС77-53128 от 14.03.2013

#### Учредитель:

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

**Адрес редакции:** 127051, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2

**E-mail:** biopreparaty@expmед.ru

**Телефон:** +7 (495) 625-43-48, доб. 63-35, 63-42, 63-08, 63-36

**Сайт:** www.biopreparations.ru

**Издатель:** ООО «Ваше Цифровое Издательство»

**Юридический адрес:** 109263, Москва, ул. Шкулева, д. 9, к. 2

**E-mail:** isupport@neicon.ru

**Телефон/факс:** +7 (499) 754-99-93

**Сайт:** http://elpub.ru

Подписано в печать: 22.08.2018

Формат 60×90/8. Усл. печ. л. 9,25

Бумага мелованная. Печать офсетная

## PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Peer-reviewed scientific and practical journal

### CONTENTS

#### Reviews

- Genome-Editing and Biomedical Cell Products: Current State, Safety and Efficacy**  
A. A. Goryaev, M. V. Savkina, K. M. Mefed, V. P. Bondarev, V. A. Merkulov, V. V. Tarasov . . . . . 140
- International Approaches to Regulation of Medicinal Products Containing Viable Human Cells**  
E. V. Melnikova, A. A. Goryaev, M. V. Savkina, O. V. Merkulova, A. A. Chaplenko,  
O. A. Rachinskaya, I. S. Semenova, G. A. Trusov, V. A. Merkulov . . . . . 150
- Porcine Trypsin in the Manufacture of Biological Medicinal Products. Risks and Safety Requirements**  
S. M. Sukhanova, E. M. Petruchuk . . . . . 161
- Recommendations for Expanding Evaluation of Biological (Specific) Activity  
of Biotechnological Products in Product Specification Files**  
O. V. Golovinskaya, S. L. Lysikova, Yu. N. Lebedeva, N. A. Alpatova, A. A. Movsesyants, V. A. Merkulov . . . . . 168

#### Original Articles

- Methodological Approaches to Validation of Therapeutic Recombinant Proteins Production  
Based on the Quality by Design Concept**  
N. V. Stratonova, A. S. Lisov, A. N. Morozov, D. V. Tyupa, R. A. Khamitov . . . . . 175
- Approaches to Pharmaceutical Analysis of Modern Peptide and Oligonucleotide Products  
as Illustrated by a Small Interfering RNA-Based Novel Therapeutic  
for the Treatment of Bronchial Asthma**  
L. M. Krasnykh, V. V. Smirnov, G. V. Ramenskaya, G. F. Vasilenko, I. P. Shilovsky, M. R. Haitov . . . . . 184
- Microbial Quality of Dehydrated Media Used in the Sterility Testing  
of Immunobiological Medicinal Products**  
S. M. Sukhanova, N. E. Zakharova . . . . . 191

#### Chronicle

- Mikhail Konstantinovich Bakulin (on the 65th Anniversary)** . . . . . 198
- Vladimir Aleksandrovich Shevtsov (on the 60th Anniversary)** . . . . . 199
- In memory of Irina Grigoryevna Osipova** . . . . . 200
- In memory of Lidiya Grigoryevna Karpovich** . . . . . 201
- In memory of Nataliya Ivanovna Lonskaya** . . . . . 202

Mass media registration certificate:  
ПМ № ФС77-53128 of March 14, 2013

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

**Postal address:** 8/2 Petrovsky boulevard, Moscow 127051

**E-mail:** biopreparaty@expmed.ru

**Phone:** +7 (495) 625-43-48, ext. 63-35, 63-42, 63-08, 63-36

**Website:** www.biopreparations.ru

**Publisher:** «Your Digital Publishing» LLC

**Registered office:** 9/2 Shkuleva street, Moscow 109263

**E-mail:** isupport@neicon.ru

**Phone/fax:** +7 (499) 754-99-93

**Website:** http://elpub.ru

Passed for printing: August 22, 2018

Format 60×90/8. Conventional printed sheets: 9.25

Enamel-paper. Offset printing

## Редактирование генома и биомедицинские клеточные продукты: современное состояние, безопасность и эффективность

А. А. Горяев<sup>1,\*</sup>, М. В. Савкина<sup>1</sup>, К. М. Мефед<sup>1</sup>, В. П. Бондарев<sup>1</sup>, В. А. Меркулов<sup>1</sup>, В. В. Тарасов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

Успехи в технологиях *ex vivo* редактирования генома человека позволили разработать новые подходы в лечении генетических, онкологических, инфекционных и других заболеваний, в том числе с использованием биомедицинских клеточных продуктов. Но, несмотря на быстрое развитие данных технологий и большое количество проводимых клинических исследований во многих странах мира, только 4 препарата (Strimvelis, Zalmoxis, Kymriah и Yescarta), содержащие *ex vivo* генно-модифицированные клетки человека, разрешены к применению в странах Европейского союза и США. В данной работе рассмотрены три перспективные технологии (ZFN, TALEN и CRISPR), позволяющие легко и эффективно проводить редактирование генома в необходимых сайтах, тем самым создавая платформу для дальнейшего развития генной инженерии клеток человека. Описана технология получения химерных антигенных рецепторов (CAR). Также приведены сведения об эффективности и безопасности одобренных препаратов: Strimvelis, содержащего аутологичные CD34<sup>+</sup>-клетки, *ex vivo* трансдуцированные ретровирусным вектором с геном аденозиндеаминазы, Zalmoxis, содержащего модифицированные аллогенные Т-клетки, а также двух препаратов Kymriah и Yescarta, содержащих аутологичные Т-клетки с химерными антигенными рецепторами к антигену CD19, предназначенных для лечения CD19<sup>+</sup> гематологических злокачественных новообразований.

**Ключевые слова:** биомедицинские клеточные продукты (БМКП); клеточная терапия; генная терапия; химерный антигенный рецептор; редактирование генома; ZFN; TALEN; CRISPR

**Для цитирования:** Горяев АА, Савкина МВ, Мефед КМ, Бондарев ВП, Меркулов ВА, Тарасов ВВ. Редактирование генома и биомедицинские клеточные продукты: современное состояние, безопасность и эффективность. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2018;18(3):140–149. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-140-149>

\***Контактное лицо:** Горяев Артем Анатольевич; Goryaev@expmed.ru

## Genome-Editing and Biomedical Cell Products: Current State, Safety and Efficacy

A. A. Goryaev<sup>1,\*</sup>, M. V. Savkina<sup>1</sup>, K. M. Mefed<sup>1</sup>, V. P. Bondarev<sup>1</sup>, V. A. Merkulov<sup>1</sup>, V. V. Tarasov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products  
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

<sup>2</sup> I. M. Sechenov First Moscow State Medical University,  
8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

Advances in *ex vivo* technologies of human genome editing have made it possible to develop new approaches to the treatment of genetic, oncological, infectious and other diseases, which may involve the use of biomedical cell products. However, despite the rapid development of these technologies and a large number of clinical trials conducted in many countries around the world, only 4 products (Strimvelis, Zalmoxis, Kymriah and Yescarta) containing *ex vivo* genetically modified human cells are authorised for use in the European Union and the United States of America. This paper considers three promising technologies (ZFN, TALEN and CRISPR) that allow for easy and effective editing of the genome at the sites of interest, thereby creating a platform for further development of the genetic engineering of human cells. It describes the technology of engineering chimeric antigen receptors (CARs). It also provides data on the efficacy and safety of the approved products: Strimvelis which contains autologous CD34<sup>+</sup> cells transduced *ex vivo* with a retroviral vector containing adenosine deaminase gene, Zalmoxis which contains modified allogeneic T-cells, and two products: Kymriah and Yescarta which contain autologous T-cells with CARs to CD19 antigen, intended for the treatment of CD19<sup>+</sup> hematological malignancies.

**Key words:** biomedical cell products (BMCP); cell therapy; gene therapy; chimeric antigen receptor; genome editing; ZFN; TALEN; CRISPR

**For citation:** Goryaev AA, Savkina MV, Mefed KM, Bondarev VP, Merkulov VA, Tarasov VV. Genome-editing and biomedical cell products: current state, safety and efficacy. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2018;18(3):140–149. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-140-149>

\***Corresponding author:** Artem A. Goryaev; Goryaev@expmed.ru

В последние десятилетия появились новые генно-инженерные методы, которые позволяют проводить коррекцию мутаций, добавление или инактивацию генов в различных организмах и отличаются высокой точностью и эффективностью. Одной из важных возможностей, которые дали такие технологии редактирования генома, является создание новых подходов в лечении наследственных, приобретенных или инфекционных заболеваний человека [1–4]. При этом редактирование генома человека может осуществляться *in vivo*, когда генно-инженерные конструкции вводятся напрямую в организм человека, или *ex vivo* — выделенные клетки подвергаются генной модификации вне организма человека. *In vivo* редактирование генома человека не рассматривается в данном обзоре, так как такие препараты относятся к геннотерапевтическим лекарственным препаратам и регулируются Федеральным законом от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» [5]. *Ex vivo* модификации генома происходят в культивируемых клетках человека, что относит их к биомедицинским клеточным продуктам (БМКП), которые регулируются Федеральным законом от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» [6]. Необходимо отметить, что в большинстве стран мира препараты, полученные с помощью *in vivo* и *ex vivo* редактирования генома, относятся к генной терапии [7, 8].

Цель работы — описание перспективных технологий редактирования генома ZFN, TALENs и CRISPR/Cas9, возможности их *ex vivo* применения в лечении различных заболеваний, а также оценка безопасности и эффективности разрешенных к применению препаратов, содержащих *ex vivo* генетически-модифицированные клетки человека.

### Технологии редактирования генома

Для успешного редактирования генома необходимо введение сайт-специфического двухцепочечного разрыва ДНК, который репарируется клеткой с помощью гомологичной рекомбинации или негомологичным соединением концов. Гомологичная рекомбинация в присутствии «донорного» фрагмента ДНК, имеющего гомологичные последовательности к последовательностям, прилегающим к двухцепочечному разрыву ДНК, может привести к коррекции гена или же вставке необходимого гена. При негомологичном соединении концов происходят случайные вставки или делеции («indel») на месте двухцепочечного разрыва ДНК, что приводит к сдвигу рамки считывания и нокауту гена. Также негомологичное соединение концов при наличии «донорного» фрагмента ДНК может приводить к небольшим вставкам в хромосому [1, 3, 9].

Для введения сайт-специфического двухцепочечного разрыва ДНК в клетках человека в настоящее время используются различные технологии, в том числе классические методы генной инженерии, мегануклеазы («хоуминг»-эндонуклеазы семейства LAGLIDADG) и другие, но такие подходы отличаются сложностью, малой специфичностью и низкой эффективностью. На сегодняшний день наиболее перспективными являются высоко-специфичные системы ZFN, TALEN и CRISPR [2, 10–12].

#### ZFN

ZFN (от англ. Zinc-Finger Nuclease) представляют собой класс химерных белков, состоящих из ДНК-связывающих доменов и каталитической субъединицы эндонуклеазы FokI (рис. 1). ДНК-связывающий домен получил название «цинковый палец», так как третичная структура, стабилизированная ионом цинка, похожа на «палец». Один «цинковый палец» узнает определенный триплет за счет 4 аминокислотных остатков в положении 1, 2, 3 и 6  $\alpha$ -спирали, и, изменяя данные

аминокислотные остатки, можно создавать новые «цинковые пальцы» к новым триплетам. Комбинируя несколько «цинковых пальцев», можно создавать конструкции, которые будут с высокой специфичностью связываться с необходимой последовательностью ДНК. Нуклеаза FokI способна к внесению двухцепочечного разрыва только в составе гомодимера, поэтому подбирают специфические целевые сайты на разных цепях ДНК (рис. 1) [2, 11, 13, 14].

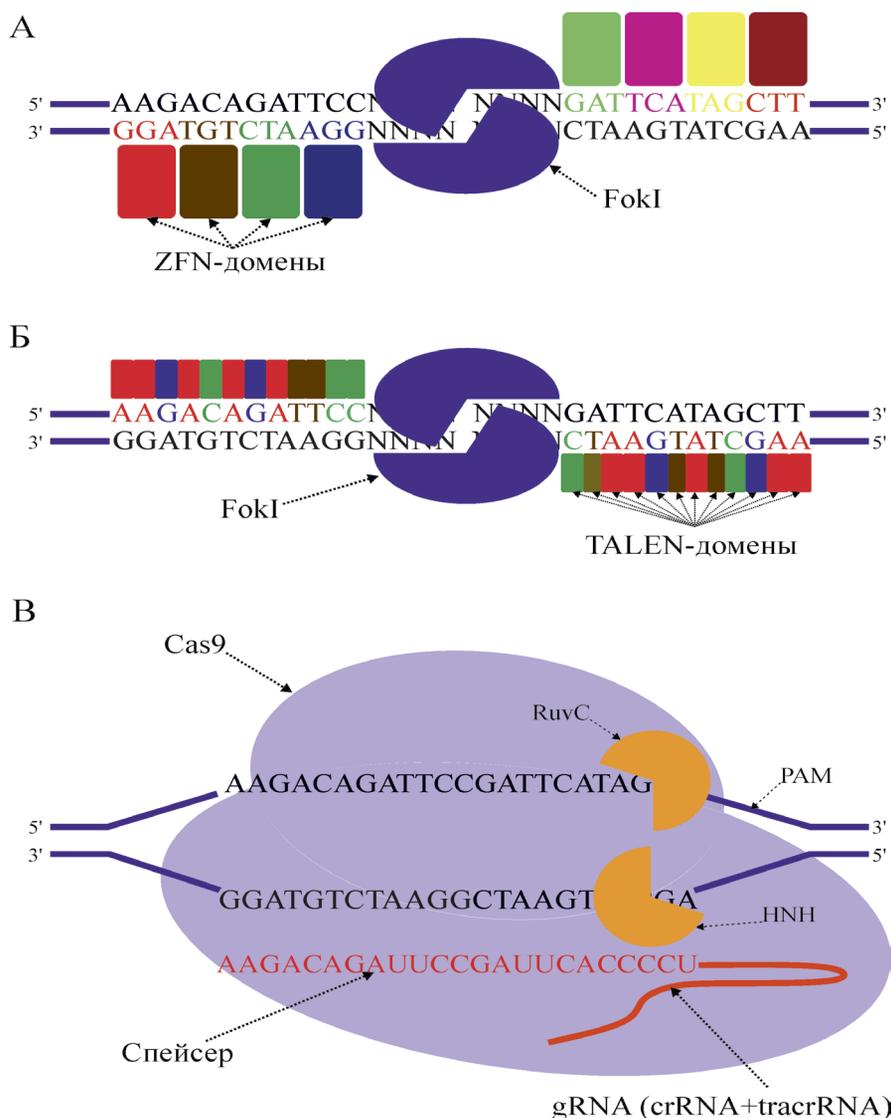
#### TALEN

TALEN (от англ. Transcription Activator-Like Effector Nucleases) основан на использовании высокоспецифичных ДНК-связывающих белков, подобных активаторам транскрипции, или TALE, и каталитического домена нуклеазы FokI. ДНК-связывающий домен TALE состоит из tandemных повторов из 33–34 аминокислотных остатков. Каждый повтор является высококонсервативным, за исключением переменных аминокислотных остатков в позициях 12 и 13, отвечающих за связывание с конкретным нуклеотидом: аспарагин и глицин с тиминем; гистидин и аспарагиновая кислота с цитозином; аспарагин и изолейцин с аденином; два аспарагина с гуанином или аденином. Таким образом, комбинируя 4 домена TALE, можно легко собрать конструкцию, распознающую необходимую последовательность ДНК (рис. 1) [2, 11, 13, 16].

#### CRISPR

В отличие от ZFN и TALEN, при использовании которых для каждого проекта необходимо создание сложных конструкций ДНК-связывающих доменов и нуклеазы FokI, система CRISPR (от англ. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) состоит всего из двух элементов: CRISPR-ассоциированная нуклеаза (Cas), например Cas9, и гидовая РНК (gRNA) (рис. 1) [2, 9, 11, 13, 17]. Гидовая РНК (gRNA) представляет собой химеру из крисперной crRNA (CRISPR РНК), содержащей спейсерную последовательность, комплементарную необходимому сайту ДНК, и транс-активирующей tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA), которые соединены с помощью олигорибонуклеотидного линкера для формирования структуры «петля-стебель». Обычно в качестве нуклеазы используют Cas9, которая содержит два эндонуклеазных домена RuvC и HNH. RuvC домен разрезает некомплементарную спейсерную нить ДНК, в то время как HNH — комплементарную, образуя двухцепочечный разрыв вблизи от PAM мотива (Protospacer adjacent motif) [9, 18]. Также в качестве нуклеазы могут использоваться и другие белки, например Cpf1 [19]. Считается, что CRISPR/Cas9 по сравнению с другими системами редактирования генома обладает повышенной нецелевой «off-target» активностью, которая выражается в возможности внесения изменений вне выбранного локуса. Тем не менее простота конструирования системы CRISPR/Cas9 и возможность множественного введения модификаций в геном [12] являются причинами ее широкого применения.

По данным Европейской базы данных клинических исследований ([www.clinicaltrialsregister.eu](http://www.clinicaltrialsregister.eu)) и сайта ClinicalTrials.gov ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)), в мире зарегистрировано около 1000 клинических исследований (КИ) с использованием *ex vivo* генно-модифицированных клеток человека. Анализ предварительных данных некоторых КИ позволяет предположить возможность скорой регистрации таких препаратов. Так, компанией Sangamo Therapeutics (США) были продемонстрированы значимые результаты возможности применения технологии ZFN при лечении ВИЧ [20]. В ходе КИ NCT00842634 (открытое нерандомизированное неконтролируемое) 12 ВИЧ-положительным пациентам, получавшим высокоактивную антиретровирусную терапию (ВААРТ), однократно вводились аутологичные CD4<sup>+</sup>-лимфоциты



**Рис. 1.** Механизм действия систем редактирования генома ZFN, TALEN и CRISPR/Cas9 [14, 15]. А — ZFN. «Цинковый палец» распознает три нуклеотида, FokI при димеризации вызывает двухцепочечный разрыв ДНК; Б — TALEN. Каждый домен TALE распознает один нуклеотид, FokI при димеризации вызывает двухцепочечный разрыв ДНК; В — CRISPR/Cas9. Для распознавания «целевой» ДНК используется гидовая РНК (gRNA), состоящая из crRNA с ДНК-связывающей последовательностью (спейсер) и tracrRNA. Cas9 содержит два каталитических домена RuvC и HNH, вносящих разрывы на разных цепях ДНК. PAM — короткий NGG мотив, необходимый для связывания Cas9 и внесения двухцепочечного разрыва ДНК.

**Fig. 1.** The mechanism of ZFN, TALEN and CRISPR/Cas9 genome editing systems [14, 15]. А — ZFN. A zinc finger recognizes three nucleotides, FokI dimerization causes DNA double strand break; Б — TALEN. Each TALE domain recognizes one nucleotide, FokI dimerization causes DNA double strand break; В — CRISPR/Cas9. A guide RNA (gRNA), consisting of crRNA with a DNA-binding sequence (spacer) and tracrRNA, is used for recognition of target DNA. Cas9 contains two catalytic domains RuvC and HNH, which cleave different DNA strands. PAM — is a short NGG motif, which is essential for Cas9 binding and DNA double strand break.

с «редактированным» геном CCR5. Внесение делеции в транс-мембранный домен гена CCR5 приводит к нарушению проникновения ВИЧ в Т-клетки. После введения генно-модифицированных клеток у всех пациентов повышалось количество CD4<sup>+</sup>-клеток в крови, а средний период полувыведения модифицированных Т-клеток составлял 48 недель, что позволило части пациентов отказаться от ВААРТ [21].

Также одним из перспективных направлений применения технологий редактирования генома является создание генно-инженерных Т-лимфоцитов, кодирующих химерный антигенный рецептор, или CAR (от англ. Chimeric Antigen Receptor) [1]. Введение CAR в Т-лимфоциты позволяет «нацеливать» их на выбранные антигены клеток, например, антигены раковых клеток, а специфическое рецепторное взаимодействие CAR

с опухолевыми антигенами приводит к активации, пролиферации лимфоцитов и к гибели раковой клетки [22, 23].

CAR состоит из нескольких доменов (рис. 2). Антигенраспознающий элемент (scFv) состоит из вариабельных областей L и H цепей иммуноглобулина и необходим для связывания со специфичным антигеном на поверхности клеток-мишеней. Для облегчения связывания с антигеном и возможности отклонения в различные стороны scFv связан со спейсером, обычно представляющим собой иммуноглобулиноподобные CH2-CH3 (Fc) домены IgG, либо спейсерным доменом CD4 или CD8. Для закрепления CAR на поверхности лимфоцита используется трансмембранный домен, состоящий из одного трансмембранного участка CD3ζ, CD4, CD8, OX40 или H2-Kb. Внутриклеточная часть CAR состоит из костимулирующего домена (один

или несколько доменов CD28, CD27, 4-1BB), необходимого для обеспечения пролиферации и выживания Т-лимфоцитов, продукции цитокинов, а также сигнального домена (CD3 $\zeta$ ), активирующего лимфоцит [23–26].

В последние годы для создания CAR Т-клеток активно используют технологии TALEN и CRISPR. В 2017 г. в США были начаты два КИ (UCART123) с использованием аллогенных CAR Т-клеток, направленных против CD $^{123+}$ -клеток, для лечения бластического плазмоцитоидного дендритного клеточного новообразования и острого миелоидного лейкоза. В Китае проходят несколько КИ, в которых оценивается безопасность и эффективность CAR, направленных против PD-1 солидных опухолей. В Российской Федерации, по данным сайта ClinicalTrials.gov, зарегистрировано только одно КИ I/II фазы (NCT03467256), которое будет проводиться ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. В ходе КИ планируется оценить безопасность и эффективность применения аутологичных CAR Т-клеток для лечения рефрактерного и рецидивирующего В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) на 18 пациентах в возрасте от 3 месяцев до 25 лет [27].

### Зарегистрированные препараты, содержащие *ex vivo* генно-модифицированные клетки человека

Несмотря на большое количество проводимых КИ, на сегодняшний день в мире ни один препарат, полученный с помощью технологий ZFN, TALEN и CRISPR, не разрешен к применению. Вместе с тем в странах Европейского союза и США разрешены к применению 4 препарата: Strimvelis, Zalmoxis, Kymriah, Yescarta, содержащие *ex vivo* генно-модифицированные клетки человека.

#### Strimvelis

В 2016 г. Европейское агентство по лекарственным препаратам (European Medicines Agency, EMA) разрешило к применению лекарственный препарат Strimvelis, содержащий аутологичные CD34 $^{+}$  клетки, *ex vivo* трансдуцированные ретровирусным вектором, кодирующим аденозиндезаминазу (АДА). Strimvelis показан для лечения пациентов с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью (ТКИН), обусловленной дефицитом аденозиндезаминазы, для которых не найден совместимый донор [28].

Наиболее эффективным способом лечения АДА-ТКИН является трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) от полностью совместимого по HLA (от англ. Human Leucocyte Antigens) донора, однако вероятность найти такого донора среди родных братьев или сестер составляет менее 25 %. При использовании ТГСК от частично совместимого неродственного донора выживаемость пациента составляет менее 68 %. Остальным пациентам обычно назначаются заместительная ферментная терапия, внутривенное введение иммуноглобулинов, интенсивная антибактериальная, противогрибковая и противовирусная терапии [29, 30].

Применение Strimvelis дает возможность обходить ограничение в доступности совместимых доноров, при этом он противопоказан людям, которые болеют или болели лейкемией или миелодисплазией, инфицированным ВИЧ, гепатитами В и С, а также пациентам, которым ранее проводилась генная терапия. Безопасность и эффективность Strimvelis была изучена в трех КИ (AD1115611, n = 12; AD1117054/AD1117056, n = 3; AD1117064, n = 3) на 18 детях с АДА-ТКИН в возрасте от 0,5 до 6,1 года (медианный возраст 1,7 года). Из 18 пациентов,

включенных в КИ, 15 ранее получали лечение аденозиндезаминазой, конъюгированной с ПЭГ, четверым была проведена неудачная ТГСК. Всем пациентам в течение двух дней перед применением Strimvelis проводили кондиционирование бусульфаном, обладающим цитостатическим действием на миелоидные клетки, после которого они получали однократную внутривенную инфузию в диапазоне доз (0,9–18,2)·10 $^6$  CD34 $^{+}$  клеток на 1 кг массы тела [28, 31, 32].

Средняя продолжительность наблюдения составила 6,9 года (от 2,3 до 13,4 года), в течение которого выжили 100 % пациентов. Применение Strimvelis приводило к восстановлению иммунитета: уменьшалась степень инфицирования, увеличивалась продукция иммуноглобулинов, 58 % испытуемых прекращали внутривенное введение иммуноглобулина, появлялся гуморальный ответ на вакцинацию, нормализовались популяция Т-клеток (CD3 $^{+}$ , CD4 $^{+}$  и CD8 $^{+}$  клеток) и тимопоз с устойчивой способностью к пролиферации Т-клеток [32].

Безрецидивная выживаемость, определяемая как выживание без необходимости повторного введения ПЭГ-АДА или ТГСК, составила 86 %. Три пациента возобновили долгосрочное лечение ПЭГ-АДА из-за плохого восстановления иммунитета, один из них получил вторую дозу Strimvelis (лечение не было успешным), а двум другим была проведена успешная ТГСК от братьев и сестер, родившихся после начала КИ.

Учитывая небольшую выборку пациентов, участвовавших в КИ, выявленные нежелательные реакции (НР) не могут дать полной перспективы в отношении характера и частоты таких событий. Наиболее частыми НР были лихорадка, инфекции

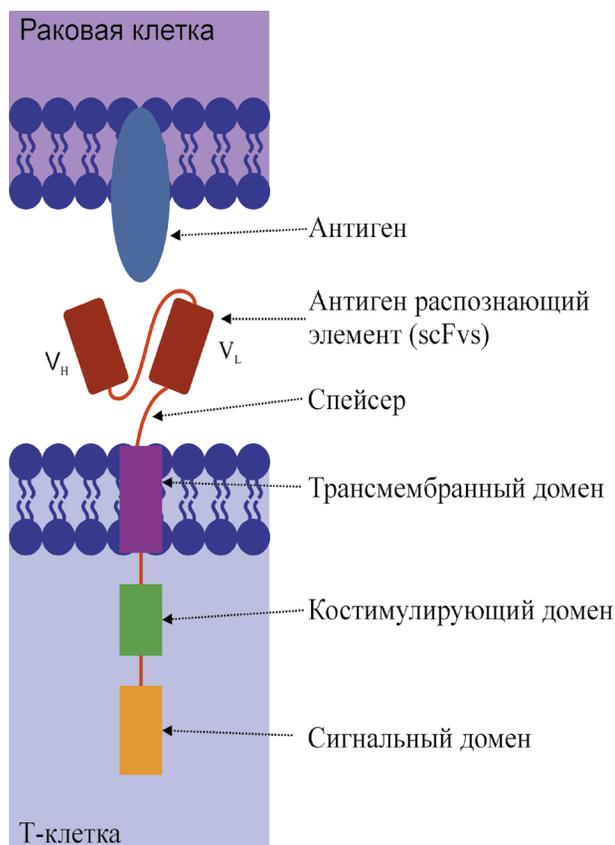


Рис. 2. Структура химерного антигенного рецептора (CAR) [25, 26]. Пояснения указаны в тексте.  
Fig. 2. The structure of a chimeric antigen receptor (CAR) [25, 26]. Explanations are provided in the text.

верхних дыхательных путей, гастроэнтерит и диарея. Часть НР (анемия, нейтропения, повышенное давление и др.) были связаны с применением бусульфана. Пятнадцать пациентов сообщили о 39 серьезных нежелательных реакциях (СНР), среди которых были пневмония, инфекции мочевыводящих путей, гастроэнтерит. Никакие СНР не были смертельными или связаны с Strimvelis. Также в период проведения КИ сообщалось о различных аутоиммунных реакциях (наличие антинуклеарных антител, аутоиммунная гемолитическая анемия, аутоиммунная апластическая анемия, аутоиммунный гепатит, аутоиммунная тромбоцитопения и синдром Гийена — Барре). Помимо одного сообщения об аутоиммунной апластической анемии, все НР регистрировались в период от 3 месяцев до 3 лет после введения Strimvelis. Считается, что часть выявленных побочных реакций связана с восстановлением иммунитета в силу их характера и сроков. Также за все время наблюдений не зарегистрированы случаи онкологических заболеваний [28, 32].

### Zalmoxis

Zalmoxis состоит из генетически модифицированных аллогенных Т-клеток, экспрессирующих «суицидный» ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-TK) и усеченный ген низкоаффинного рецептора фактора роста нервов ( $\Delta$ LNGFR). Тимидинкиназа вируса простого герпеса фосфорилирует ганцикловир в трифосфатное соединение, которое конкурентно ингибирует встраивание дезоксирибозина трифосфата в ДНК, что приводит к гибели клетки. Ген  $\Delta$ LNGFR используется для идентификации трансдуцированных клеток [33].

Zalmoxis предназначен в качестве дополнительной терапии при гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (гаплогТГСК) взрослым с высоким риском гематологических злокачественных новообразований. Введение *ex vivo* генетически модифицированных Т-клеток пациентам, перенесшим гаплогТГСК, должно помочь организму восстановить иммунитет, повысить успех трансплантации и поддержать долгосрочный противораковый эффект. Восстановление иммунитета вызвано необходимостью снижения заболеваемости бактериальными, грибковыми и вирусными инфекциями пациентов после гаплогТГСК, так как полная регенерация Т- и В-клеток происходит в течение 2 лет (в зависимости от возраста и предшествующего лечения), также на восстановление влияет иммуносупрессивная терапия для профилактики реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [34, 35].

Введение аллогенных Т-клеток также может вызывать РТПХ, но за счет введенного «суицидного» гена HSV-TK и применения ганцикловира/валганцикловира реакцию можно контролировать или избегать [36].

Zalmoxis получил условное разрешение EMA на продажу в 2016 г. (Conditional Marketing Authorisation) на основании завершенного КИ ТК007 (I/II фаза, NCT00423124) и продолжающегося ТК008 (III фаза, NCT00914628), окончательный отчет о котором будет представлен к концу 2022 г. В качестве контрольной группы сравнения использовали данные 140 пациентов из базы Европейской группы по трансплантации крови и костного мозга (European Group for Blood and Marrow Transplantation, EBMT), которым была проведена гаплогТГСК [33].

Эффективность оценивалась по восстановлению иммунитета (первичная) и определялась как число (%) пациентов, у которых количество Т-клеток ( $CD3^+$ ) было равно или больше  $10^8/л$  (и/или  $CD4^+$ -клеток  $\geq 5 \cdot 10^8/л$  и/или  $CD8^+$ -клеток  $\geq 5 \cdot 10^8/л$ ). Также оценивались общая и безрецидивная выживаемость, инфекционная заболеваемость, острая и долгосрочная токсичность, связанные с инфузиями Zalmoxis [33].

Для проведения КИ ТК007 (NCT00423124) были отобраны 52 пациента с различными злокачественными заболеваниями кровяной системы, из которых 22 были исключены по причине ранней смерти, отторжения трансплантата или длительного введения ганцикловира или иммуносупрессивной терапии [37]. Остальным 30 пациентам были проведены от одной до четырех инфузий Zalmoxis в рекомендуемой дозе  $1 \cdot 10^7$  клеток/кг. Восстановление иммунитета наблюдалось у 23 из 30 пациентов, или 77 % (95 % ДИ: 59–88), в течение первых 23 сут (диапазон 13–42 сут) от даты проведения инфузии. Концентрация Т-клеток ( $CD3^+$ ) не достигла установившегося уровня у пациентов, которым вводились по 3 или 4 инфузии. Также наблюдалась тенденция более медленного восстановления уровня  $CD4^+$ -клеток по сравнению с  $CD8^+$ -клетками. Общая выживаемость в течение первого года составляла 40 %, 2 лет — 30 % и 5 лет — 27 %. Частота смертности без рецидивов составила 50 % ( $\pm 7$  %) через 1 год и 5 лет. Кумулятивная смертность без рецидивов у 23 пациентов с восстановленным иммунитетом составила 17 % (4 % связаны с инфекционными заболеваниями), по сравнению с 76 % смертностью (38 % от инфекций) у 29 пациентов из группы сравнения. Количество инфекционных заболеваний было ниже у пациентов с восстановленным иммунитетом ( $n = 23$ ) по сравнению с пациентами, у которых не было зарегистрировано восстановление иммунитета ( $n = 7$ ), что также приводило к снижению смертности — 17 и 71 % соответственно [33, 37].

В ходе КИ было зарегистрировано 603 НР, из которых по степени тяжести 8,6 % были умеренными, 23,9 % — средней тяжести, 34,5 % — тяжелыми и 14,3 % — опасными для жизни. Считается, что только 24 (3,9 %) НР связаны с введением *ex vivo* генно-модифицированных клеток. Наиболее частые НР (249 из 603) были вызваны инфекционными заболеваниями, 35 % из которых связаны с реактивацией цитомегаловируса. Из получавших лечение, у 10 пациентов развилась острая и у 1 — хроническая РТПХ, которые не привели к гибели. Десяти пациентам проводили лечение ганцикловиром, что приводило к значительному сокращению количества циркулирующих  $\Delta$ LNGFR Т-клеток. СНР были связаны с цитомегаловирусной инфекцией (42 %), рецидивирующими лейкозами (21 %) и пневмонией (12 %).

22 (73 %) из 30 пациентов, получавшие генетически модифицированные Т-клетки, умерли во время исследования по сравнению с 21 (95 %) из 22 пациентов контрольной группы. Необходимо отметить, что высокая частота смертности связана с тем, что у пациентов, участвующих в КИ, были опасные для жизни гематологические злокачественные новообразования, для которых отсутствуют методы лечения [33].

### Kymriah

Kymriah является первым препаратом аутологичной Т-клеточной иммунотерапии, одобренным Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (Food and Drug Administration, FDA). Препарат состоит из аутологичных генно-модифицированных Т-клеток, в геном которых введен ген, кодирующий CAR к CD19 злокачественных и нормальных В-лимфоцитов (табл. 1). При связывании антиген распознающего элемента, представляющего собой одноцепочечный фрагмент мышинового антитела, с антигеном CAR передает сигнал для стимулирования Т-клеток, их экспансии, активации, цитотоксической и цитолитической активности, что приводит к гибели  $CD19^+$ -клеток [38].

Kymriah показан пациентам в возрасте до 25 лет с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ) с повторными рецидивами или рефрактерной

**Таблица 1.** Одобренные препараты, содержащие *ex vivo* генно-модифицированные клетки человека  
**Table 1.** Authorised products containing *ex vivo* genetically modified human cells

Наименование	Характеристика препаратов			
	Strimvelis	Zalmoxis	Kymriah	Yescarta
Производитель	GlaxoSmithKline plc*, Италия	MolMed SpA, Италия	Novartis, США	Kite Pharma, США
Тип продукта	Аутологичный	Аллогенный	Аутологичный	Аутологичный
Клетки	CD34 <sup>+</sup> -клетки	Т-клетки	Т-клетки	Т-клетки
Векторная система	Ретровирус	Ретровирус	Лентивирус	Ретровирус
Экспрессируемый ген	Аденозиндезаминаза	Низкоаффинный рецептор фактора роста нервов (ΔLNGFR) и тимидинкиназа вируса простого герпеса (HSV-TK)	CAR к CD19	CAR к CD19
Доза	от 2·10 <sup>6</sup> до 20·10 <sup>6</sup> клеток/кг	1·10 <sup>7</sup> клеток/кг	от 0,2·10 <sup>6</sup> до 5·10 <sup>6</sup> клеток/кг пациентам с массой до 50 кг; от 0,1·10 <sup>6</sup> до 2,5·10 <sup>6</sup> клеток/кг пациентам с массой более 50 кг	2·10 <sup>6</sup> клеток/кг, максимальная доза 2·10 <sup>8</sup> клеток/кг в 68 мл
Показания	Лечение пациентов с тяжелым комбинированным иммунодефицитом, вызванным недостаточностью аденозиндезаминазы	Дополнительная терапия при гаплогТГСК у взрослых с высоким риском гематологических злокачественных новообразований	До 25 лет: лечение острого лимфобластного лейкоза из В-линейных предшественников, который является рефрактерным или во втором или более позднем рецидиве; Взрослые пациенты: лечение рецидивирующей или рефрактерной диффузной В-крупноклеточной лимфомы после двух или более линий терапии	Лечение рецидивирующей или рефрактерной диффузной В-крупноклеточной лимфомы после двух или более линий терапии
Страна (год регистрации)	ЕС (2016)	ЕС (2016)	США (2017); ЕС (2018)	США (2017); ЕС (2018)

\*С 2018 г. права переданы компании Orchard Therapeutics, Великобритания.

формой (r/r), а также взрослым пациентам с r/r диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДБККЛ), получавшим две или более линий терапий [39].

В открытом неконтролируемом КИ NCT02228096, проведенном на 63 пациентах, средний возраст которых составил 12 лет (3–23 года), оценивалась эффективность Kymriah при ВП-ОЛЛ по достижению полной ремиссии (ПР) в течение 3 месяцев после инфузии препарата, продолжительности ПР и доле пациентов с ПР с минимальной остаточной болезнью (МОБ). Среди 63 пациентов, все из которых были МОБ-негативными, ПР достигли 40 (63 %), частичной ремиссии (ЧР) — 12 (19 %) (табл. 2). Вторичная конечная точка по продолжительности ответа не была достигнута (диапазон от 1,2 до 14,1 месяца). Среди 52 пациентов, достигших ПР или ЧР, у 13 отмечалось развитие рецидива, из них трое впоследствии умерли после лечения Kymriah, и двое — после начала другой терапии. Таким образом, коэффициент развития рецидива составил 75,4 % (95 % ДИ: 57,2–86,7) через 6 месяцев и 63,8 % (95 % ДИ: 41,5–79,4) через 12 месяцев [38, 40].

Оценку эффективности Т-клеточной иммунотерапии у пациентов с ДБККЛ, которые ранее получали более двух линий химиотерапии, включая ритуксимаб и антрациклин, или с рецидивами после аутологичной ТГСК, осуществляли в ходе открытого неконтролируемого КИ NCT02445248. Исследование проводили в 10 странах Северной Америки, Европы, Австралии и Японии на 106 пациентах, получивших Kymriah [41]. Эффективность оценивалась по частоте объективного ответа (ЧОО) и длительности ответа (ДО) (табл. 3). Из 68 пациентов 50 % имели полный или частичный ответ, при этом среднее время до первого ответа на Kymriah со-

ставило 0,9 месяца (0,7–3,3 месяца). Средняя ДО не была достигнута [38, 39, 42].

Учитывая эффективность Т-клеток, модифицированных CAR, применение Kymriah связано с высокими рисками развития СНР, в том числе жизнеугрожающих состояний, среди которых синдром высвобождения цитокинов (Cytokine release syndrome, CRS), нейротоксичность, нейтропения, цитопения, продолжающаяся более 28 сут, инфекции и гипогаммаглобулинемия.

**Таблица 2.** Данные эффективности лечения r/r ВП-ОЛЛ препаратом Kymriah [38]

**Table 2.** Data on the efficacy of treatment of refractory or relapsed (r/r) B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BP-ALL) by Kymriah [38]

Показатель эффективности	Количество пациентов (n = 63)
ПР/ЧР (95 % ДИ)	52 (83 %) (71–91)
ПР	40 (63 %)
ЧР	12 (19 %)
ПР или ЧР с МОБ (95 % ДИ)	52 (83 %) (71–91)
Медиана (месяцы) продолжительности ремиссии (95 % ДИ)	Не достигнута (7,6–НО)

*Примечание.* ПР — полная ремиссия; ЧР — полная ремиссия с неполным восстановлением показателей крови; МОБ — минимальная остаточная болезнь (негативная); НО — невозможно оценить.

**Таблица 3.** Сравнение частоты и длительности ответов при лечении r/r ДБККЛ препаратами Kymriah и Yescarta [38, 43]  
**Table 3.** Comparison of the frequency and duration of responses in the treatment of refractory or relapsed (r/r) diffuse large B-cell lymphoma by Kymriah and Yescarta [38, 43]

Частота ответа	Препарат	
	Kymriah	Yescarta
	Количество пациентов	
	[n = 68]	[n = 101]
ЧОО (ПО+ЧО) (95 % ДИ)	34 (50 %) (37,6–62,4)	73 (72 %) (62–81)
Частота полного ответа (ПО) (95 % ДИ)	22 (32 %) (21,5–44,8)	52 (51 %) (41–62)
Частота частичного ответа (ЧО) (95 % ДИ)	12 (18 %) (9,5–28,8)	21 (21 %) (13–30)
ДО (в месяцах)	Количество пациентов	
	[n = 34]	[n = 73]
Медиана ДО (95 % ДИ)	НО (5,1–НО)	9,2 (5,4–НО)
ДО, если лучший ответ это ПО (95 % ДИ)	НО (10,0–НО)	НО (8,1–НО)
ДО, если лучший ответ это ЧО (95 % ДИ)	3,4 (1,0–НО)	2,1 (1,3–5,3)

*Примечание.* 95 % ДИ — 95 % доверительный интервал; НО — невозможно оценить; ЧОО — частота объективного ответа; ПО — полный ответ; ЧО — частичный ответ; ДО — длительность ответа.

CRS, включая смертельные или опасные для жизни реакции, развивался у 54 (79 %) пациентов с r/r ОЛЛ и 78 (74 %) с r/r ДБККЛ. Лечение CRS проводилось тоцилизумабом и/или кортикостероидами (например, метилпреднизолон). Среднее время до разрешения CRS составляло 8 сут (диапазон 1–36). В двух КИ было зафиксировано пять смертей в течение 30 сут после инфузии Kymriah: два пациента с r/r ОЛЛ умерли с CRS и прогрессирующей лейкемией или внутричерепным кровоизлиянием, у 3 пациентов с r/r ДБККЛ был CRS в условиях стабильного прогрессирующего заболевания. Основными проявлениями CRS были лихорадка (92 %), гипотония (67 %), гипоксия (20 % ОЛЛ, 35 % ДБККЛ) и тахикардия (30 % ОЛЛ, 14 % ДБККЛ), также CRS был связан с печеночной, почечной и сердечной недостаточностью и коагулопатией [38, 39].

У 49 (72 %) пациентов с ОЛЛ и 62 (58 %) с ДБККЛ наблюдалась неврологическая токсичность, выражавшаяся в головной боли (37 и 21 %), энцефалопатии (34 и 16 %), делирии (21 и 6 %), тревожности (13 и 9 %), нарушении сна (10 и 9 %), головокружении (6 и 11 %), треморе (9 и 7 %) и периферической невропатии (4 и 8 %), а также единичными случаями судорог, мутизма и афазии [38]. Также СНР были связаны с развитием инфекционных заболеваний (55 %), которые привели к смерти 3 пациентов, фебрильной нейтропении или вирусной реактивации гепатита В [38, 39].

#### Yescarta

Препарат Yescarta также является препаратом аутологичной Т-клеточной иммунотерапии, содержащим CAR к CD19 антигену. Он предназначен для лечения пациентов с r/r ДБККЛ, включая первичную медиастинальную В-крупноклеточную лимфому (ПМВКЛ) и фолликулярную лимфому, после двух или более линий терапии [43, 44].

В открытом неконтролируемом КИ NCT02348216 из 111 пациентов, подвергшихся лейкаферезу, 101 была проведена инфузия Yescarta, девяти другим пациентам не проводилось

лечение из-за прогрессирующего заболевания или серьезных побочных реакций после лейкафереза. Средний возраст пациентов составил 58 лет (23–76), 76 % которых были с ДБККЛ, 16 % — с фолликулярной лимфомой и 8 % — с ПМВКЛ. Среднее количество предшествующих методов лечения составляло 3 (1–10), 77 % пациентов имели рефрактерность, а у 21 % был рецидив в течение 1 года после аутологичной ТГСК. После инфузии Yescarta ЧОО составила 72 %, а среднее время ответа — 0,9 месяца (0,8–6,2 мес). Из 52 пациентов, достигших ПО, 14 изначально имели стабильное заболевание. Медиана длительности ответа составила 9,2 месяца (табл. 3) [44]. Длительность ответа была значительно больше у пациентов с полной ремиссией по сравнению с пациентами с частичной ремиссией. Среди пациентов, достигших ПО, ДО не была достигнута (8,1–НО), тогда как оценочная медиана ДИ среди пациентов с ЧО составила всего 2,1 месяца (1,3–5,3 мес) [43, 45].

У 108 пациентов (7 из фазы I КИ и 101 из фазы II КИ), которых лечили Yescarta, СНР наблюдались у 56 (52 %), выражавшиеся CRS, неврологической токсичностью, серьезными инфекционными заболеваниями, фебрильной нейтропенией, длительной цитопенией и гипогаммаглобулинемией. В КИ было зарегистрировано 34 случая смерти пациентов, из которых 30 — от прогрессирующего заболевания, а 4 были связаны с применением препарата (в соответствии с анализом FDA). Среднее время начала CRS составляло 2 сут (1–12), а среднее время до его разрешения — 7 сут (2–58). CRS проявлялся лихорадкой, гипотонией, тахикардией, гипоксией и ознобом. СНР включали сердечную аритмию (включая фибрилляцию предсердий и желудочковую тахикардию), остановку сердца, сердечную и почечную недостаточность, синдром капиллярной утечки, гипотензию, гипоксию и синдром активации макрофагов и гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз. Тоцилизумаб получали 45 % пациентов с CRS. Среднее время возникновения неврологической токсичности составляло 4 сут (1–43), которая продолжалась в среднем 17 сут. У одного пациента была от-

мечена длительная энцефалопатия продолжительностью до 173 сут. Наиболее распространенные проявления неврологической токсичности включали энцефалопатию, головную боль, тремор, головокружение, афазию, делирий, бессонницу и беспокойство. Проявления неврологической токсичности компенсировали поддерживающей терапией и/или кортикостероидами. Также в связи с тем, что Yescarta активна в отношении нормальных В-клеток, пациентам с гипогаммаглобулинемией внутривенно вводился препарат гамма-глобулина [43, 44].

Несмотря на высокую эффективность лечения Kymriah и Yescarta, существуют опасения относительно долгосрочной эффективности в связи со снижением терапевтических эффектов после 6 месяцев и возможностью развития устойчивости раковых клеток к CAR T-клеткам. Поэтому для данных препаратов необходимо продолжение долгосрочных исследований эффективности и безопасности.

### Заключение

Таким образом, показана возможность, безопасность и эффективность лечения с использованием клеток человека с *ex vivo* отредактированным геномом. Тем не менее некоторые вопросы остаются нерешенными, в том числе долгосрочная эффективность и безопасность, наличие серьезных и жизнеугрожающих побочных эффектов, наличие нецелевой («off-target») активности. Одним из способов повышения безопасности применения могло бы быть добавление механизмов, контролирующих экспрессию генов или жизнеспособность модифицированных клеток. Например, компания Bellco разработала технологии GoCAR-T и CaspaCIDE®. В GoCAR-T двойной ко-стимулирующий домен разделен на два домена, один из которых (MyD88/CD40) перенесен на отдельно располагающийся «молекулярный переключатель», регулируемый римидуцидом. За счет такого разделения ко-стимулирующего домена можно контролировать активацию и пролиферацию T-клеток путем введения пациенту различного количества римидуцида [46]. В технологии CaspaCIDE® домен связывания химического индуктора димеризации связан с сигнальным доменом каспазы-9, которая активируется при связывании с римидуцидом, что приводит к апоптозу клетки [47]. Контролирование активности T-клеток, содержащих CAR, позволит не только повысить безопасность терапии, но и, возможно, повысить ее эффективность за счет увеличения времени циркулирования модифицированных клеток.

Также важным фактором широкого распространения терапии с использованием технологий редактирования генома является экономическая составляющая, связанная со сложностью технологического процесса производства, высокой стоимостью препаратов (Strimvelis — € 594 000, Yescarta — \$ 350 000, Kymriah — \$ 475 000), возможностью проведения лечения только в медицинских учреждениях, обладающих специально обученным персоналом.

Несмотря на существующие проблемы, быстрый прогресс в технологиях редактирования генома и культивирования клеток человека, в том числе и возможность появления новых технологий генной инженерии, а также успехи в КИ являются источником оптимизма для будущего этой области и широкого распространения новых методов лечения заболеваний человека.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590045-2).

**Acknowledgments.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00023-18-02 and was supported by the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590045-2).

**Информация об отсутствии конфликта интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

### Литература / References

1. Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Mol Ther.* 2016;24(3):430–46. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.10>
2. Cai M, Yang Y. Targeted genome editing tools for disease modeling and gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2014;14(1):2–9. <https://doi.org/10.2174/156652321402140318165450>
3. Perez-Pinera P, Ousterout DG, Gersbach CA. Advances in targeted genome editing. *Curr Opin Chem Biol.* 2012;16(3–4):268–77. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.06.007>
4. Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. History of gene therapy. *Gene.* 2013;525(2):162–9. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.137>
5. Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». [Federal Law of the Russian Federation of April, 12, 2010, No. 61-FZ «On Circulation of Medicines» (In Russ.)]
6. Федеральный закон Российской Федерации от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах». [Federal Law of the Russian Federation of June, 23, 2016, No. 180-FZ «On Biomedical Cell Product» (In Russ.)]
7. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community Code Relating to Medicinal Products for Human Use.
8. US Food and Drug Administration. Application of Current Statutory Authorities to Human Somatic Cell Therapy Products and Gene Therapy. *Federal Register.* 1993;58(197):53248–51. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/UCM148113.pdf>
9. Nemudryi AA, Valetdinova KR, Medvedev SP, Zakian SM. TALEN and CRISPR/Cas genome editing systems: tools of discovery. *Acta Naturae.* 2014;6(3):19–40.
10. He Z, Proudfoot C, Whitelaw CB, Lillico SG. Comparison of CRISPR/Cas9 and TALENs on editing an integrated EGFP gene in the genome of HEK293FT cells. *Springerplus.* 2016;5(1):814. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2536-3>
11. Germini D, Tsfasman T, Zakharova VV, Sjakste N, Lipinski M, Vassetzky Y. A comparison of techniques to evaluate the effectiveness of genome editing. *Trends Biotechnol.* 2018;36(2):147–59. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.10.008>
12. Guha TK, Wai A, Hausner G. Programmable genome editing tools and their regulation for efficient genome engineering. *Comput Struct Biotechnol J.* 2017;15:146–60. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.12.006>
13. Gaj T, Gersbach CA, Barbas III CF. ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 2013;31(7):397–405. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004>
14. Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics.* 2011;188(4):773–82. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.131433>
15. Chen KY, Knoepfler PS. To CRISPR and beyond: the evolution of genome editing in stem cells. *Regen Med.* 2016;11(8):801–16. <https://doi.org/10.2217/rme-2016-0107>
16. Li T, Huang S, Jiang WZ, Wright D, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(1):359–72. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq704>

17. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816–21. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
18. Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys*. 2017;46:505–29. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
19. Kleinstiver BP, Tsai SQ, Prew MS, Nguyen NT, Welch MM, Lopez JM, et al. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*. 2016;34(8):869–74. <https://doi.org/10.1038/nbt.3620>
20. Kwarteng A, Ahuno ST, Kwakye-Nuako G. The therapeutic landscape of HIV-1 via genome editing. *AIDS Res Ther*. 2017;14:32. <https://doi.org/10.1186/s12981-017-0157-8>
21. Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med*. 2014;370(10):901–10. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1300662>
22. Ghobadi A. Chimeric antigen receptor T cell therapy for Non-Hodgkin Lymphoma. *Curr Res Transl Med*. 2018;66(2):43–9. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2018.03.005>
23. Kulemzin SV, Kuznetsova VV, Mamonkin M, Taranin AV, Gorchakov AA. Engineering chimeric antigen receptors. *Acta Naturae*. 2017;9(1):6–14.
24. Harris DT, Kranz DM. Adoptive T Cell Therapies: A comparison of T cell receptors and chimeric antigen receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37(3):220–30. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.11.004>
25. Jackson HJ, Rafiq S, Brentjens RJ. Driving CAR T-cells forward. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(6):370–83. <https://dx.doi.org/10.1038%2Fnrclinonc.2016.36>
26. Fesnak AD, June CH, Levine BL. Engineered T Cells: The promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(9):566–81. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.97>
27. CD19 T-CAR for treatment of children and young adults with r/r B-ALL (NCT03467256). Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03467256?term=NCT03467256&rank=1>
28. Annex I — summary of product characteristics. In: Strimvelis: EPAR — product information. EMA. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/003854/WC500208199.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/003854/WC500208199.pdf)
29. Booth C, Gaspar HB, Thrasher AJ. Treating immunodeficiency through HSC gene therapy. *Trends Mol Med*. 2016;22(4):317–27. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.02.002>
30. Aiuti A, Ficara F, Cattaneo F, Bordignon C, Roncarolo MG. Gene therapy for adenosine deaminase deficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2003;3(6):461–6.
31. Cicalese MP, Ferrua F, Castagnaro L, Pajno R, Barzagli F, Giannelli S, et al. Update on the safety and efficacy of retroviral gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *Blood*. 2016;128(1):45–54. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-688226>
32. Cicalese MP, Ferrua F, Castagnaro L, Rolfe K, De Boever E, Reinhardt RR, et al. Gene therapy for adenosine deaminase deficiency: a comprehensive evaluation of short- and medium-term safety. *Mol Ther*. 2018;26(3):917–31. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.12.022>
33. Assessment report. Zalmoxis (EMA/CHMP/589978/2016). EMA; 2016.
34. Li HW, Sykes M. Emerging concepts in haematopoietic cell transplantation. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(6):403–16. <https://doi.org/10.1038/nri3226>
35. Atilla E, Atilla PA, Bozdağ SC, Demirer T. A review of infectious complications after haploidentical hematopoietic stem cell transplantations. *Infection*. 2017;45(4):403–11. <https://doi.org/10.1007/s15010-017-1016-1>
36. Greco R, Oliveira G, Stanghellini MT, Vago L, Bondanza A, Peccatori J, et al. Improving the safety of cell therapy with the TK-suicide gene. *Front Pharmacol*. 2015;6:95. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00095>
37. Ciceri F, Bonini C, Stanghellini MT, Bondanza A, Traversari C, Salomoni M, et al. Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study. *Lancet Oncol*. 2009;10(5):489–500. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70074-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70074-9)
38. Summary basis for regulatory action — KYMRIA. FDA; 2018. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM606836.pdf>
39. Package insert — KYMRIA. FDA. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM573941.pdf>
40. Maude SL, Pulsipher MA, Boyer MW, Grupp SA, Davies SM, Phillips CL, et al. Efficacy and safety of CTL019 in the first US phase II multicenter trial in pediatric relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia: results of an interim analysis. *Blood*. 2016;128(22):2801. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/2801/tab-figures-only>
41. Study of Efficacy and Safety of CTL019 in Adult DLBCL Patients (JULIET) (NCT02445248). Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02445248>
42. Schuster SJ, Bishop MR, Tam C, Waller EK, Borchmann P, McGuirk J, et al. Global pivotal phase 2 trial of the CD19-targeted therapy CTL019 in adult patients with relapsed or refractory (r/r) diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) — an interim analysis. *Hematological Oncology*. 2017;35(S2):27. [https://doi.org/10.1002/hon.2437\\_6](https://doi.org/10.1002/hon.2437_6)
43. Summary basis for regulatory action — YESCARTA. FDA; 2017. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM584335.pdf>
44. Package insert — YESCARTA. FDA. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM581226.pdf>
45. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2017;377(26):2531–44. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707447>
46. Wilkins O, Keeler AM, Flotte TR. CAR T-cell therapy: progress and prospects. *Hum Gene Ther Methods*. 2017;28(2):61–6. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2016.153>
47. Zhou X, Di Stasi A, Tey S-K, Krance RA, Martinez C, Leung KS, et al. Long-term outcome and immune reconstitution after haploidentical stem cell transplant in recipients of allodepleted-T-cells expressing the inducible Caspase-9 safety transgene. *Blood*. 2014;123(25):3895–905. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-551671>

### Об авторах

**Горяев Артем Анатольевич**, канд. биол. наук, заместитель начальника управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-1620-6233>

**Савкина Мария Владимировна**, канд. биол. наук, эксперт 1 категории управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-8527-2157>

**Мефед Кирилл Михайлович**, канд. биол. наук, главный эксперт лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-1755-6649>

**Бондарев Владимир Петрович**, д-р мед. наук, профессор, директор Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6472-6386>

**Меркулов Вадим Анатольевич**, д-р мед. наук, профессор, заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

**Тарасов Вадим Владимирович**, канд. фарм. наук, доцент, директор Института фармации и трансляционной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Поступила 29.05.2018

Принята к публикации 09.08.2018

### Authors

**Artem A. Goryaev**, Candidate of Biological Sciences, Deputy Head of the Division for Expert Evaluation of Antibacterial Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-1620-6233>

**Maria V. Savkina**, Candidate of Biological Sciences, 1st Professional Category Expert of the Division for Expert Evaluation of Antibacterial Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-8527-2157>

**Kirill M. Mefed**, Candidate of Biological Sciences, Chief Expert of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-1755-6649>

**Vladimir P. Bondarev**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6472-6386>

**Vadim A. Merkulov**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Deputy Director-General for Medicinal Products' Evaluation of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

**Vadim V. Tarasov**, Candidate of Pharmaceutical Sciences, Assistant Professor, Director of the Institute of Pharmacy and Translational Medicine of FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University)

Received 29 May 2018

Accepted 9 August 2018

## Международный опыт нормативно-правового регулирования препаратов, содержащих жизнеспособные клетки человека

Е. В. Мельникова, А. А. Горяев, М. В. Савкина, О. В. Меркулова, А. А. Чапленко\*, О. А. Рачинская, И. С. Семенова, Г. А. Трусов, В. А. Меркулов

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

Интенсивное развитие клеточных технологий обуславливает внедрение в мировую медицинскую практику препаратов на основе жизнеспособных клеток человека, которые в большинстве стран определяются как биологические лекарственные препараты. Авторами проведен сравнительный анализ нормативно-правовой базы разных стран мира и определены особенности регулирования препаратов для клеточной терапии (аналогов биомедицинских клеточных продуктов). В некоторых странах существуют механизмы приоритетного рассмотрения препаратов для клеточной терапии для вывода на рынок, например процедуры ускоренного рассмотрения, ускоренного утверждения, условной регистрации. Учитывая новизну нормативной базы и биологические особенности инновационных препаратов — биомедицинских клеточных продуктов, в Российской Федерации подобные механизмы в настоящее время отсутствуют. Биомедицинские клеточные продукты в России являются отдельным классом медицинских средств, отличным от биологических лекарственных препаратов, и регулируются Федеральным законом № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» от 23 июня 2016 г. Основным отличием регулирования клеточных препаратов в России является принцип единых требований вывода на рынок аутологичных, аллогенных и комбинированных биомедицинских клеточных продуктов и отсутствие механизма «исключения для больничного производства» (hospital exemptions), действующего во многих странах и заключающегося в допущении применения персонализированного аутологичного препарата, произведенного в конкретной лаборатории при медицинской организации для определенного пациента по назначению конкретного врача.

**Ключевые слова:** биомедицинские клеточные продукты (БМКП); исключения для больничного производства; регулирующий орган; предмет регулирования; клеточная терапия

**Для цитирования:** Мельникова ЕВ, Горяев АА, Савкина МВ, Меркулова ОВ, Чапленко АА, Рачинская ОА, Семенова ИС, Трусов ГА, Меркулов ВА. Международный опыт нормативно-правового регулирования препаратов, содержащих жизнеспособные клетки человека. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2018;18(3):150–160. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-150-160>

**Контактное лицо:** Чапленко Александр Андреевич; chaplenko@expmed.ru

## International Approaches to Regulation of Medicinal Products Containing Viable Human Cells

E. V. Melnikova, A. A. Goryaev, M. V. Savkina, O. V. Merkulova, A. A. Chaplenko\*, O. A. Rachinskaya, I. S. Semenova, G. A. Trusov, V. A. Merkulov

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

The intensive development of cellular technologies stipulates the introduction at the global level of medicinal products based on viable human cells, which in most countries are referred to as biomedical cell products. The authors conducted a comparative analysis of the regulatory framework in different countries and determined special aspects of regulation of cell therapy products (analogues of biomedical cell products). Some countries have mechanisms for priority review of cell therapy products for marketing authorization, such as accelerated assessment, accelerated approval, or conditional marketing authorisation. These mechanisms are currently absent in Russia, because of the novelty of the regulatory framework, and the biological properties of innovative cell products. Biomedical cell products are regarded as a separate class of medicinal products in Russia, they are not treated as biologicals and are regulated by the Federal Law No. 180-FZ «On Biomedical Cell Products» of June 23, 2016. The main difference in regulation of cell-based products in the Russian Federation is the principle of unified requirements for marketing authorisation of autologous, allogeneic, and combined biomedical cellular products, and the absence of the «hospital exemptions» mechanism that exists in many countries. This mechanism allows prescription and use of personalised autologous medicines produced in the laboratory of a medical institution for a particular patient.

**Key words:** biomedical cell products; hospital exemptions; regulatory agency; object of regulation; cell therapy

**For citation:** Melnikova EV, Goryaev AA, Savkina MV, Merkulova OV, Chaplenko AA, Rachinskaya OA, Semenova IS, Trusov GA, Merkulov VA. International approaches to regulation of medicinal products containing viable human cells. BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2018;18(3):150–160. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-150-160>

**Corresponding author:** Alexander A. Chaplenko; chaplenko@expmed.ru

С 1 января 2017 г. в Российской Федерации вступил в силу Федеральный закон № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» (далее 180-ФЗ), который позволяет разрабатывать, производить и использовать в России биомедицинские клеточные продукты (БМКП), содержащие жизнеспособные клетки человека и являющиеся отдельным классом медицинских средств, отличным от лекарственных препаратов, регулируемых Федеральным законом № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». В настоящее время интенсивно происходит разработка и внедрение нормативно-правовых актов, обеспечивающих действие 180-ФЗ и регулирующих производство, доклинические (ДКИ), клинические исследования (КИ), порядок государственной регистрации. В соответствии с утвержденным Правительством Российской Федерации Планом мероприятий («дорожной картой») «Развитие биотехнологий и геномной инженерии» на 2018–2020 гг., уже в 2018 году должен быть создан производственный центр коллективного пользования, разработки и доклинических исследований (ДКИ) БМКП, а к 2020 году должно быть создано как минимум два подобных центра, имеющих лицензию на производство БМКП; для проведения клинических исследований (КИ) БМКП должно быть аккредитовано 5 медицинских организаций в 2018 году, 20 — в 2019 и 50 — к 2020 году [1]. Кроме того, приоритетность урегулирования вопросов ускоренного вывода на рынок разрабатываемых БМКП, включая этапы ДКИ, КИ и государственной регистрации, закреплена распоряжением Правительства Российской Федерации № 870-р от 5 мая 2018 г. [2].

Целью обзора является сравнительный анализ нормативно-правовой базы разных стран, регулирующей обращение в медицинской практике препаратов на основе клеток человека. В обзоре представлен опыт зарубежного правового регулирования новых для России продуктов регенеративной медицины.

До принятия 180-ФЗ на территории Российской Федерации государственная регистрация препаратов, содержащих жизнеспособные клетки человека, не проводилась, а их применение проходило в большинстве случаев в рамках получения разрешений на применение новых медицинских технологий [3]. 180-ФЗ устанавливает определенные различия в определениях, классификации, механизмах применения и признания результатов ДКИ и КИ препаратов регуляторными органами от зарубежных руководств. Так, в законодательстве большинства стран — США, Канады, Южной Кореи, Сингапура, стран Европейского союза (ЕС) препараты на основе клеток и тканей человека регулируются как лекарственные препараты и относятся к биологическим («biologicals»).

В большинстве стран выделяют следующие виды препаратов на основе клеток и тканей человека:

- терапевтические, с использованием соматических клеток и предназначенные для профилактики, диагностики и лечения заболеваний;
- аллогенные (производимые из донорского материала и предназначенные для применения другим людям);
- аутологичные (персонифицированные, полученные из материала конкретного пациента и предназначенные для применения этому же пациенту);
- тканеинженерные, предназначенные для регенерации, восстановления, замены ткани человека;
- генотерапевтические, состоящие из генетически модифицированных клеток.

При этом в отношении аутологичных, персонифицированных, предназначенных для гомологичного использования или минимально манипулированных продуктов существует ряд серьезных отличий в плане вывода на рынок и их регистрации

(маркетинговой авторизации): во многих странах существует механизм «исключения для больничного производства» (hospital exemptions) или подобный (медицинская практика). Так, например, в директиве ЕС № 1394/2007 определены продукты на основе клеток, которые не попадают под его действие: «продукты для передовых медицинских технологий, которые производятся не на рутинной основе в пределах одной страны в соответствии с индивидуальными стандартами качества в одной больнице по персональному назначению и под профессиональную ответственность врача для одного пациента...» [4]. В США в п. 361 Code of Federal Regulations 21CFR1271.10 сформировано правовое поле для минимально манипулированных (ММ) и предназначенных для гомологичного использования продуктов [5]. Однако требования к производственной лаборатории, а также к правилам забора и транспортировки биоматериала определяются в соответствии с правилами надлежащей тканевой практики (Good Tissue Practice, GTP). К минимальным манипуляциям с клетками в законодательстве большинства стран относят: разделение и извлечение; выделение специфических клеток (за исключением выделения после биологической/химической обработки); обработку антибиотиками; промывку; стерилизацию гамма-лучами; замораживание/оттаивание и/или другие процедуры, в которых клетки не используются с целью получения различных структур и изменения их функций.

Лидером по применению продуктов на основе клеток человека в рамках механизма «исключений для больничного производства» на сегодняшний день является Германия. Для получения разрешения на применение необходимо только документальное подтверждение соответствия производственной лаборатории требованиям надлежащей производственной практики (Good Manufacturing Practice, GMP) и наличие стандартных операционных процедур у компании-разработчика клеточного продукта и у клиники (заказчика) [6].

Примером реализации продуктов на основе клеток человека в рамках «больничного производства» может также служить украинская Медицинская компания «Ілава», которая в 2014–2017 гг. в рамках социального проекта «Биотех-реабилитация раненых» провела лечение по восстановлению дефектов костей (при боевых переломах) 47 пациентам (к концу 2017 г. у 39 пациентов лечение завершено, у 8 — продолжалось) тканеинженерным эквивалентом кости (ТИЭК) с предварительно засеянными аутологичными эндотелиальными клетками-предшественниками, выделенными из костного мозга (КМ). Возраст раненых составлял от 21 года до 48 лет. До поступления в клинику раненым было выполнено от 2 до 27 операций. Раненые поступали через 2–22 мес. после ранения (в среднем через 10,1 мес.). Общая эффективность лечения дефектов костей конечностей, полученных в результате боевых ранений, с использованием ТИЭК составила 90,4 % [7]. Кроме того, данная компания проводит лечение грыж межпозвоночных дисков, контузионных повреждений спинного мозга, критических дефектов костей черепа аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) производного нервного гребня [8].

В законодательстве Российской Федерации на сегодняшний день отсутствует механизм применения препаратов на основе жизнеспособных клеток человека (БМКП), аналогичный «hospital exemptions», однако определен принцип единых требований вывода на рынок аутологичных, аллогенных и комбинированных БМКП. Основным признаком отнесения клеточного препарата к БМКП в соответствии с 180-ФЗ является накопление (культивирование) клеток человека, входящих в его состав, а также их модификация (статья 4 180-ФЗ, каса-

ющаяся приготовления клеточных линий, входящих в состав БМКП), т. е. генетические модификации или дифференцировка при использовании факторов роста. Также в российском законодательстве в настоящее время отсутствует и определение минимально манипулированных клеток.

Одним из первых руководств США, касающихся препаратов на основе клеток человека, было Руководство по терапии соматическими клетками и генной терапии (руководство для промышленности), утвержденное уже в 1998 г. [9]. В ЕС основное Руководство по лекарственным препаратам на основе клеток было принято в 2006 г. [10]. В США подобная группа препаратов называется «клетки и ткани человека, а также препараты, основанные на клетках и тканях» («Human cells, tissues, or cellular and tissue-based products», НСТ/Р) и входит в компетенцию Отдела по тканям и передовой терапии CBER (Center for Biological Evaluation and Research) — Центра оценки и изучения биологических препаратов. Помимо терапии стволовыми (СК) и соматическими клетками в компетенцию данного подразделения входят препараты для генной терапии, продукты для ксенотрансплантации, выделенные из природных источников, и рекомбинантные белки для гематологии, устройства для медицинского применения. Правовое поле для НСТ/Р сформировано в Code of Federal Regulations 21CFR1271.10 США — раздел «351 НСТ/Р» [5]. В США первоначально подается заявка на исследование применения нового препарата, результаты рассмотрения которой показывают клиническую значимость нового продукта, основанные на данных о качестве и ДКИ. Затем для вывода препарата на рынок необходимо лицензирование препарата (заявка рассматривается от 10 до 12 месяцев с момента подачи заявки).

В регуляторной практике США осуществляется ряд инициатив в поддержку развития генной и клеточной терапий [11, 12]. К ним относятся:

- назначение приоритетного рассмотрения заявки на лицензирование препаратов для лечения орфанных заболеваний (Priority Review designation, введено в 1997 г., предполагает сокращение процедуры с 12 до 6 месяцев);
- ускоренное утверждение (Accelerated Approval, введено в 1992 г.) препаратов для лечения жизнеугрожающих состояний, орфанных и онкологических заболеваний;
- присвоение статуса ускоренного рассмотрения (Fast Track designation, 1997 г.), статуса препарата прорывной терапии (Breakthrough Therapy designation, 2012 г.) или статуса передового препарата регенеративной медицины (Regenerative Medicine Advanced Therapy, RMAT, 2016 г.).

Необходимо отметить, что все препараты на основе клеток человека, особенно нацеленные на закрытие необеспеченных медицинских потребностей (unmet medical needs), лечение серьезных и жизнеугрожающих заболеваний, подвергаются ускоренному процессу рассмотрения (Fast Track designation).

Механизмом рассмотрения инновационных препаратов для регистрации регулирующим органом ЕС, направленным на восполнение необеспеченных медицинских потребностей, является механизм приоритетной медицины (PRIME), который действует с 2016 г. и заключается в ускоренной процедуре оценки представленных материалов в заявках на КИ и маркетинговой авторизации [13]. Подобный механизм SAKIGAKE действует также в Японии с 2016 года [14]. Кроме того, в странах ЕС препарат для клеточной терапии (КТ) может получить статус «условной регистрации» (Conditional marketing authorisation) при успешно завершённых I/II фазах КИ [15].

На базе Европейского медицинского агентства (European Medicines Agency, EMA) создан Комитет по передовой терапии

(Committee for Advanced Therapies, CAT), в компетенцию которого входит оценка качества, безопасности и эффективности препаратов генной, клеточной терапии и тканевой инженерии. Препараты на основе клеток «Cell-based medicinal products» относятся к препаратам передовой терапии (Advanced-therapy medicinal products). Основным документом, регулирующим разработку, производство и обращение таких препаратов, является Директива ЕС № 1394/2007, в соответствии с которой все клеточные продукты для допуска на рынок стран ЕС должны получить одобрение ЕМА [4].

Учитывая отличия препаратов генной и клеточной терапии от классических биологических лекарственных средств, оценка заявок на маркетинговую авторизацию (Marketing Authorisation Applications, MAA) может проводиться с учетом риск-ориентированного подхода. В Европе разработан документ, в котором излагаются подходы к рассмотрению заявок на МAA генных и клеточных препаратов, где «риск-ориентированный подход» определяется как «стратегия, направленная на определение объема качественных, доклинических и клинических данных, подлежащих включению в МAA, в соответствии с научными руководящими принципами, касающимися качества, безопасности и эффективности лекарственных средств, и на обоснование любого отклонения от технических требований, определенных в части IV приложения I Директивы 2001/83/ЕС» [16].

В октябре 2017 г. Генеральный директорат Европейской комиссии по здравоохранению и безопасности пищевых продуктов (DG SANTE) и ЕМА опубликовали совместный план действий по содействию разработке препаратов и методов передовой терапии. Основная цель — упорядочить процедуры маркетинговой авторизации и решать конкретные вопросы разработчиков препаратов передовой терапии (ППТ). В соответствии с данным планом ожидается принятие:

- руководства по генной терапии и обзора руководства по генетически модифицированным клеткам (2018 г.), в которых будут представлены нормативные требования для разработчиков новых методов лечения ППТ [17]: уточнены требования к разработке, контролю качества, ДКИ и КИ генетически модифицированных клеток, а также рассмотрены новые технологии редактирования генома при создании ППТ, в частности, с использованием технологии CRISPR/Cas9; разработаны руководства по качеству, ДКИ и КИ препаратов на основе генетически модифицированных клеток для иммунотерапии рака, например, с использованием технологии CAR-T с учетом имеющегося опыта;
- адаптированных требований Руководства надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice, GLP) для ППТ в плане принятия регуляторным органом КИ и предоставления разрешения на проведение маркетинговых исследований в случаях, когда проведение ДКИ, соответствующих требованиям GLP, не представляется возможным;
- изменений в Руководство ЕМА по безопасности, эффективности и управлению рисками для ППТ (2018 г.) [18];
- специфических правил надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice, GCP) для ППТ (2019 г.);
- пояснений о новых методах редактирования генома (2018 г.).

На рисунках 1–6 представлены особенности регулирования препаратов КТ в Канаде, Австралии, Японии, Южной Корее, Сингапуре и на Тайване. Несмотря на существующие в этих странах законодательства, происходит постоянное и активное их развитие, в том числе выражающееся в разработке новых нормативно-правовых актов, руководств и научных принципов оценки качества, безопасности и эффективности таких препаратов. Вместе с тем количество зарегистрированных (разрешенных

КАНАДА		
<b>Регулирующий орган:</b> Дирекция по биологической и генетической терапии (Biologics and Genetic Therapies Directorate, BGTD) [19]		
Закон о пищевых продуктах и лекарственных средствах (Food and Drugs Act (R.S.C., 1985, c. F-27)) [20]	«Safety of Human Cells, Tissues and Organs for Transplantation Regulations (SOR/2007-118)» [21]	<b>Не регулируются</b>
<b>Предмет регулирования</b>		
Регулируются как биологические лекарственные средства: - препараты клеточной терапии, которые получены не по технологии ММ (в том числе аутологичные и для гомологичного применения); - ксеногенные, даже если использована технология ММ и предполагается гомологичное применение; - негомологичное использование, даже если применена технология ММ и препараты аутологичные; - применение предполагает системный эффект; - основная функция клеток зависит от их метаболической активности, даже если применена технология ММ и препараты аутологичные	Клеточные продукты, соответствующие следующим критериям: - клетки, ткани и органы, которые предназначены для гомологичного использования или для аллогенного применения; - не относятся к клапанам сердца и твердой мозговой оболочке; - не содержат ткани и клетки, обладающие системным эффектом и зависящие от их метаболической активности для первичной функции; - за исключением клеток островков Лангерганса и лимфогематopoэтических клеток, полученных из костного мозга, периферической крови или пуповинной крови; - не являются медицинскими устройствами; - клетки, ткани и органы, которые не являются предметом клинических исследований; - не используются компоненты крови, продукты крови и цельная кровь, за исключением пуповинной крови и периферической крови при трансплантации лимфогематopoэтических клеток; - не содержат клетки и ткани, которые регулируются в соответствии с Актом о репродукции человека (Assisted Human Reproduction Act) или любым из его правил; - не содержат сперму (регулируется (Processing and Distribution of Semen for Assisted Conception Regulations)	Аутологичные клеточные продукты, если они: - подвергаются минимальной манипуляции; - выполняют одну и ту же основную функцию после трансплантации; - не обладают системным эффектом; - основная функция не зависит от метаболической активности клеток [19]

Рис. 1. Регулирование препаратов клеточной терапии в Канаде [19].  
Fig. 1. Regulation of cell therapy drugs in Canada [19].

АВСТРАЛИЯ		
<b>Регулирующий орган:</b> Управление по контролю товаров медицинского назначения (Therapeutic Goods Administration, TGA)		<b>Не регулируются</b>
Therapeutic Goods Act 1989; Therapeutic Goods Regulations 1990; Therapeutic Goods (Charges) Regulations 1990; Therapeutic Goods (Things that are not Biologicals) Determination No. 1 of 2011; Therapeutic Goods (Things that are Biologicals) Specification 2017 (No. 1); Therapeutic Goods (Manufacturing Principles) Determination No. 1 of 2013; Therapeutic Goods (Excluded Goods) Order No. 1 of 2011; Therapeutic Goods Orders (Product Standards for Biologicals)		Клетки для трансплантации костного мозга, ткани и клетки для трансплантации, репродуктивные клетки и клетки человека, которые: 1) собраны у пациента, который находится под клиническим наблюдением и лечением врача, зарегистрированного по закону государства или внутренней территории; 2) изготовлены врачом или лицом/лицами, находящимися под профессиональным наблюдением этого врача, для терапевтического применения при лечении одного показания и в одном курсе лечения пациента [22]
<b>Предмет регулирования</b>		
Под определением «Biological» понимается только клеточная и тканевая терапия и препараты, которые состоят из клеток человека (или тканей) или их содержат, предназначены для терапевтического применения, а также живые клетки животных, ткани и органы. Согласно возможному риску (тип манипуляций, гомологичность/негомологичность применения, изменение свойств) препараты клеточной терапии разделяют на 4 класса: <b>Класс 1</b> зарезервирован для наименее регулируемых продуктов и в настоящее время не содержит предлагаемых продуктов; <b>Класс 2</b> предназначен для продуктов, полученных с минимальными манипуляциями и предназначенных для гомологичного применения; <b>Класс 3</b> предназначен для продуктов, подвергшихся более чем минимальным манипуляциям и используемых для гомологичного и негомологичного применения, например дендритно-клеточные вакцины или аутологичные МСК для восстановления хряща; <b>Класс 4</b> представляет собой препараты с самым высоким риском применения и требует наибольшего надзора (к данному классу относятся продукты, клетки которых были изменены, например генетическая модификация)		

Рис. 2. Регулирование препаратов клеточной терапии в Австралии [23].  
Fig. 2. Regulation of cell therapy drugs in Australia [23].

<b>ЯПОНИЯ</b>	
<p>Продукты регенеративной медицины и технологии <b>определяются</b> как обработанные живые клетки человека/животных, которые предназначены для:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) реконструкции, восстановления или формирования структур или функций человеческого тела;</li> <li>2) лечения или профилактики болезней или для генной терапии</li> </ol>	<p><b>Не регулируется:</b>                  трансплантация органов, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток и продуктов крови, даже если они состоят из живых клеток</p>
<p>Закон о лекарственных средствах и медицинских устройствах (Pharmaceuticals and Medical Devices Act, PMD, № 84/2013) [24]</p>	
<b>Предмет регулирования</b>	
<p>Согласно PMD, при заявлении производителем данных о безопасности и базовой эффективности на людях клеточного продукта, изготовленного по стандартам PMD, для данного продукта может быть получено условное маркетинговое одобрение сроком до семи лет. Данное условное разрешение может быть получено при демонстрации «гетерогенности» качества продукта, отражающего индивидуальные различия аутологичных продуктов небольшой популяции пациентов, или при клинической значимости предложенной терапии по сравнению с ранее существовавшими способами лечения. Также необходимым условием является использование продуктов регенеративной медицины врачами, обладающими достаточными знаниями и опытом в регенеративной медицине.</p> <p>В течение условного разрешения компании должны представить дополнительно сведения, подтверждающие эффективность и безопасность продукта. Если за этот период эффективность и безопасность продукта не будет подтверждена, маркетинговое одобрение продукта будет отменено. Хотя условное маркетинговое одобрение позволяет ускоренно утверждать продукты регенеративной медицины, следует отметить, что это является только опцией и распространяется не на все продукты клеточной терапии</p>	<p>ASRM регулирует регенеративную медицинскую практику (технологии), предоставляемую в клиниках и частной медицинской практике, и уточняет меры, необходимые для обеспечения безопасности пациентов. В рамках ASRM технологии клеточной терапии классифицируются по трем категориям, основанным на потенциальных рисках, зависящих от источника клеток (аутологичные, аллогенные, эмбриональные стволовые клетки / индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, соматические стволовые клетки, соматические клетки), типа и степени манипуляции, типа применения (гомологичное/негомологичное) и наличия других факторов. Выделяют три класса препаратов:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) высокий риск — стволовые клетки, iPS, генно-модифицированные, аллогенные или ксеногенные клетки;</li> <li>2) средний риск — клетки для восстановления, репарации или образования структуры человеческого тела;</li> <li>3) низкий риск — продукты для гомологичного применения.</li> </ol> <p>Согласно ASRM, любое медицинское учреждение, которое намерено применять технологию клеточной терапии, должно представить предварительный план в Специальный комитет по регенеративной медицине. В случае одобрения медицинское учреждение должно ежегодно уведомлять комитет о количестве пациентов, заболеваемости и инвалидности, связанных с применением клеточной терапии, давать общую оценку безопасности и научную приемлемость конкретной клеточной терапии. В дальнейшем ежегодные отчеты публикуются в сети Интернет. Необходимо отметить, что обработка человеческих клеток может проводиться за пределами медицинского учреждения, в таком случае данный объект должен проходить лицензионный контроль</p>

**Рис. 3.** Регулирование препаратов клеточной терапии в Японии [25].  
**Fig. 3.** Regulation of cell therapy drugs in Japan [25].

<b>РЕСПУБЛИКА КОРЕЯ</b>	
<p><b>Регулирующий орган:</b> Министерство безопасности пищевых продуктов и лекарств (Ministry of Food and Drug Safety, MFDS)</p>	
<p>Закон о фармацевтической продукции (Pharmaceutical Affairs Act, PAA)</p>	
<p>В соответствии с Положением о рассмотрении и авторизации биологических продуктов (Regulation on Review and Authorization of Biological Products) под продуктом клеточной терапии понимается лекарственный препарат, полученный путем физических, химических и/или биологических манипуляций, таких как <i>in vitro</i> культивирование аутологичных, аллогенных или ксеногенных клеток</p>	
<b>Предмет регулирования</b>	
<p>Продукты клеточной терапии (КТ), регулируемые PAA, включают соматические клетки, стволовые клетки и комбинированные продукты (скаффолд или другие устройства). Для регистрации продукта КТ необходимо получение документа на соответствие производства требованиям GMP, данные ДКИ в соответствии с GLP и КИ по GCP.</p> <p>Многие продукты КТ регистрируются в рамках программы расширенного доступа, ускоренного одобрения или предварительного рассмотрения, поскольку эти продукты предназначены для пациентов с серьезными и опасными для жизни заболеваниями, для которых отсутствуют методы лечения. Программа расширенного доступа к исследуемым препаратам для лечения или использования в чрезвычайных ситуациях до получения разрешения на продажу может быть одобрена MFDS для лечения пациентов, не включенных в продолжающиеся КИ. Данные о неблагоприятных событиях, эффективности и безопасности, наблюдаемых у этих пациентов, должны быть представлены в MFDS. Если исследуемый продукт на стадии КИ удовлетворяет требованиям орфанных препаратов или предназначен для лечения онкологических заболеваний, то он может быть зарегистрирован MFDS до завершения всех необходимых КИ с последующим представлением их данных.</p> <p>Система предварительного рассмотрения позволяет заявителям представить часть документов, касающихся качества, безопасности, эффективности, аспектов GMP и других вопросов в MFDS до подачи заявки на регистрацию с целью проведения консультаций.</p> <p>С 2013 г. в Республике Корея с целью повышения эффективности сбора информации о безопасности продукции клеточной терапии от держателей лицензии требуются сообщения обо всех случаях применения продукта КТ в течение первых 2 лет после регистрации</p>	<p>PAA <b>не регулирует</b> медицинскую практику применения клеточных продуктов, полученных с помощью минимальных манипуляций, не влияющих на безопасность аутологичных или аллогенных клеток, в медицинских центрах. Данная медицинская практика регулируется Законом о медицинском обслуживании (Medical Service Act). Но если минимально манипулируемые продукты клеточной терапии производились за пределами медицинского центра или комбинированы с каким-либо устройством, то тогда они должны будут утверждаться в соответствии с PAA</p>

**Рис. 4.** Регулирование препаратов клеточной терапии в Республике Корея [26].  
**Fig. 4.** Regulation of cell therapy drugs in Republic of Korea [26].

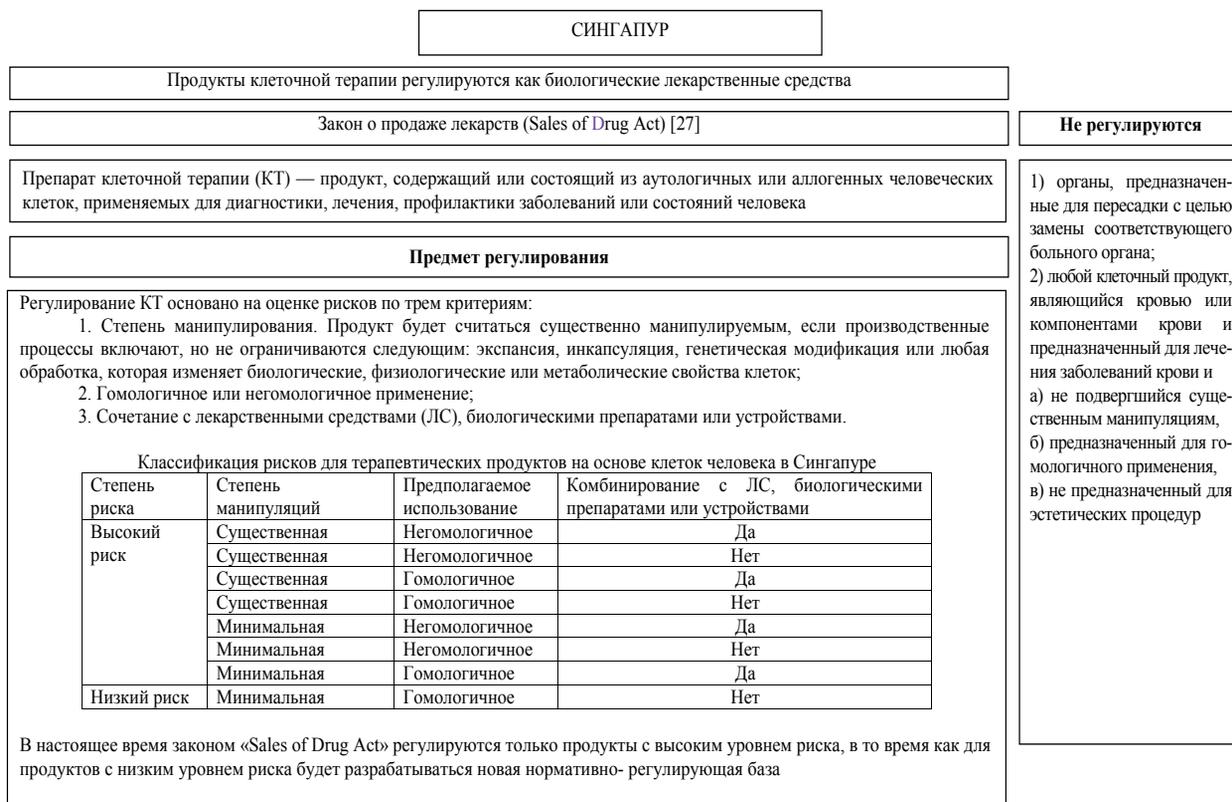


Рис. 5. Регулирование препаратов клеточной терапии в Сингапуре [25].  
Fig. 5. Regulation of cell therapy products in Singapore [25].

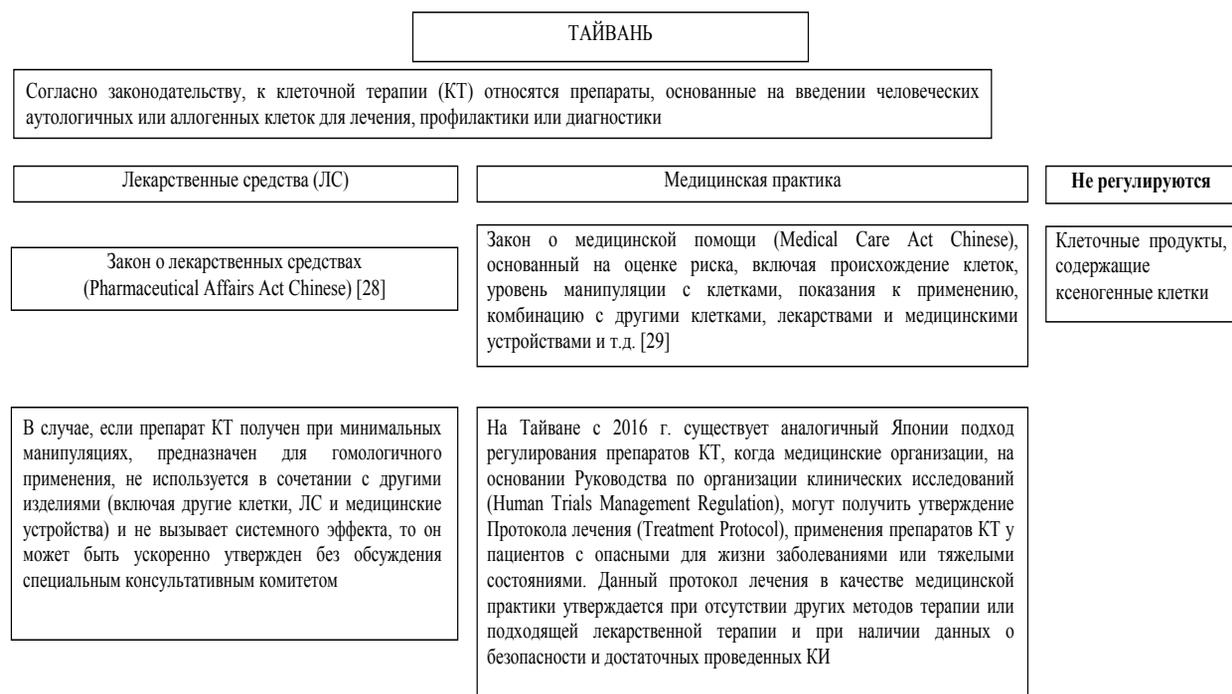


Рис. 6. Регулирование препаратов клеточной терапии на Тайване [30].  
Fig. 6. Regulation of cell therapy products in Taiwan [30].

**Таблица 1.** Зарегистрированные в мире препараты, содержащие клетки человека  
**Table 1.** Human cell-based products authorised for marketing in the world

№	Страна	Год регистрации	Наименование препарата	Производитель	Используемые клетки	Показания
АУТОЛОГИЧНЫЕ						
1.	США	2010	Provenge (sipuleucel-T)	Dendreon Corp.	CD54 <sup>+</sup> -клетки	Лечение метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы
2.		2011	Laviv (Azficel-T)	Fibrocell Technologies	Фибробласты	Улучшение внешнего вида взрослых с умеренной и тяжелой формой носогубных складок
3.		2012	MACI (Autologous Cultured Chondrocytes on a Porcine Collagen Membrane)	Vericel Corp.	Хондроциты	Восстановление дефектов коленного хряща
4.		2017	Kymriah (tisagenlecleucel)	Novartis Pharmaceuticals Corporation	Генетически модифицированные Т-лимфоциты, несущие химерный антигенный рецептор к CD19 <sup>+</sup>	Лечение острого лимфобластного лейкоза (до 25 лет), рецидивирующей или рефрактерной диффузной В-крупноклеточной лимфомы (взрослые)
5.		2017	Yescarta (axicabtagene ciloleucel)	Kite Pharma, Incorporated	Генетически модифицированные Т-лимфоциты, несущие химерный антигенный рецептор к CD19 <sup>+</sup>	Лечение рецидивирующей или рефрактерной диффузной В-крупноклеточной лимфомы
6.	Европейский союз	2015	Holoclar	Holostem Therapie Avanzate S.R.L, Италия	Лимбальные стволовые клетки	Лечение умеренной и тяжелой форм недостаточности лимбальных стволовых клеток
7.		2016	Strimvelis	GSK, Италия	Генетически модифицированные CD34 <sup>+</sup> гемопоэтические клетки, экспрессирующие аденозиндезаминазу	Лечение тяжелого комбинированного иммунодефицита у детей, связанного с дефицитом аденозиндезаминазы (ADA-SCID)
8.		2017	Spherox	CO.DON AG, Германия	Хондроциты	Восстановление дефектов коленного хряща
9.	Япония	2007	JACE	Tissue Engineering Co. (J-TEC)	Кератиноциты человека и фибробласты мыши	Лечение ожогов, ран, рубцов, витилиго, невусов (родимых пятен), язв и других расстройств кожи
10.		2012	JACC	Tissue Engineering Co. (J-TEC)	Хондроциты и ателоколлаген	Восстановление дефектов коленного хряща
11.		2015	HeartSheet	Terumo Medical	Миобласты	Лечение тяжелой сердечной недостаточности, вызванной хронической ишемической болезнью сердца
12.	Республика Корея	2001	Chondron	Sewon Cellontech	Хондроциты	Восстановление дефектов хряща колена и лодыжки
13.		2002	Holoderm	Tego Science, Inc.	Кератиноциты	Лечение ожоговых ран
14.		2006	KeraHeal	Biosolution	Кератиноциты	Лечение ожоговых ран
15.		2007	Immuncell-LC	Green Cross Cell	Активированные Т-лимфоциты	Лечение рака печени
16.		2009	RMS ossron	Sewon Cellontech	Остеоциты	Локальная реконструкция костей
17.		2011	Cure-skin	S-biomedics	Фибробласты	Лечение гипертрофических рубцов

Продолжение таблицы 1

18.	Республика Корея	2011	Hearticellfram-AMI	Pharmicell	МСК	Лечение пациентов с инфарктом миокарда
19.		2012	Cupistem	Antrogen	МСК	Лечение анальной фистулы при болезни Крона
20.		2013	CreaVax-RCC*	JW CreaGene	Дендритные клетки	Лечение метастатической карциномы почек
21.		2014	Neuronata-R inj	Corestem	МСК	Лечение бокового амиотрофического склероза (болезнь Лу Герига)
22.	Австралия	2002	Cartogen	Mercy Tissue Engineering Pty Ltd	Хондроциты	Восстановление дефектов коленного хряща
23.	Сингапур	2002	Cartogen	Mercy Tissue Engineering Pty Ltd, Австралия	Хондроциты	Восстановление дефектов коленного хряща

АЛЛОГЕННЫЕ

1.	США	2012	Gintuit (Allogeneic Cultured Keratinocytes and Fibroblasts in Bovine Collagen)	Organogenesis Inc.	Кератиноциты и фибробласты	Восстановление слизистой оболочки полости рта
2.	Европейский союз	2016	Zalmoxis	MolMed SpA, Италия	Генетически модифицированные Т-клетки, несущие усеченную форму рецептора фактора роста человека с низким сродством ( $\Delta$ LNGFR) и тимидинкиназы вируса простого герпеса I (HSV-TK Mut2)	Дополнительное лечение при гаплоидентичной трансплантации гематопозитических стволовых клеток взрослым пациентам с высокорисковыми гематологическими злокачественными новообразованиями для восстановления иммунной системы и снижения риска реакции «трансплантат против хозяина»
3.		2018	Alofisel	TiGenix, Бельгия	МСК	Лечение параректальных свищей у пациентов с болезнью Крона
4.	Япония	2015	Temcell HS injection	JCR Pharmaceuticals Co., Ltd.	МСК	Лечение острой реакции «трансплантат против хозяина»
5.	Республика Корея	2005	Kaloderm	Tego Science, Inc.	Кератиноциты	Лечение диабетической язвы стопы и заживление глубоких ожогов
6.		2012	Cartistem	Medipost Co., Ltd.	МСК	Лечение дефектов коленного хряща в результате дегенеративного остеоартрита или повторной травмы
7.		2015	KeraHeal-Allo	Biosolution Co., Ltd.	Кератиноциты	Резпитализация глубоких ожогов кожи
8.	Канада, Новая Зеландия	2012	Prochymal	Osiris Therapeutics, Inc., США	МСК	Лечение острой реакции «трансплантат против хозяина»

Примечание: МСК — мезенхимальные стволовые клетки.  
\*Только для экспорта.

к применению) препаратов, содержащих жизнеспособные клетки человека (табл. 1), составляет всего 31 наименование, из которых 23 — аутологичных и 8 — аллогенных.

Необходимо отметить и работу международных организаций в области регулирования препаратов КТ, в частности, Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). В 2014 г. на Международной конференции уполномоченных органов в сфере

обращения лекарственных средств (International Conference of Drug Regulatory Authorities (ICDRA)) была отмечена необходимость разработки международных руководящих принципов регулирования препаратов КТ. Согласно принятой итоговой резолюции ВОЗ, следует рассмотреть возможность разработки руководств по производству, доклиническим и клиническим аспектам КТ лекарственных средств, а также осуществления

сотрудничества между регулирующими органами различных стран [31]. Разработка руководств должна проводиться экспертным комитетом по биологической стандартизации ВОЗ, однако на сегодняшний день не разработано ни одного руководства или проекта.

В рамках Азиатско-Тихоокеанского экономического сотрудничества в 2009 г. был создан Руководящий комитет по гармонизации регулирования (Regulatory Harmonization Steering Committee, RHSC), одной из целей создания которого была гармонизация правил регулирования медицинских продуктов к 2020 году на основе подхода регуляторной конвергенции путем постепенной адаптации международных технических руководств и стандартов. И одним из приоритетных направлений деятельности RHSC является КТ. В рамках данного направления была разработана «дорожная карта», целью которой является применение стратегии стимулирования и продвижения перспективной регуляторной конвергенции и применения научных принципов для обеспечения и усиления безопасности, качества и эффективности продуктов клеточной и тканевой терапии.

В Республике Беларусь в 2014 г. принято Постановление № 1120 «О некоторых вопросах государственной регистрации биомедицинских клеточных продуктов», в соответствии с которым «биомедицинские клеточные продукты — пересаженный материал, полученный на основе клеток человека, за исключением эмбриональных, фетальных и гемопоэтических стволовых клеток, генетически модифицированных клеток человека». Не подлежат регистрации СК КМ, а также СК периферической крови и пуповины, способные образовывать клетки миелоидного ряда [32].

В настоящее время в Белорусском реестре БМКП зарегистрированы 3 препарата МКК: клетки мезенхимальные (БМКП-7.103083), клетки мезенхимальные стволовые костного мозга человека (БМКП-7.103084), клетки мезенхимальные стволовые жировой ткани человека (БМКП-7.103082).

## Заключение

Таким образом, за рубежом препараты, содержащие клеточные линии человека, характеризуются разными понятиями (препараты клеточной терапии, продукты на основе соматических клеток человека и др.), а также имеют разный юридический статус. Основным фактором, обеспечивающим рост числа зарегистрированных клеточных продуктов в США и ЕС, является введение нормативных актов, обеспечивающих ускоренное прохождение препаратами клеточной терапии административных барьеров на пути к пациенту. В России, однако, такие регуляторные акты отсутствуют и не предусматриваются принятым законом о биомедицинских клеточных продуктах, кроме того, в едином ключе рассматриваются как аутологичные, так и аллогенные клеточные продукты. Однако необходимо отметить, что в последнее время обсуждаются перспективы введения механизмов ускоренного рассмотрения препаратов или методов лечения патологии, для которой таковые отсутствуют.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590045-2).

**Acknowledgments.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00023-18-02 and was supported by the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590045-2).

## Информация об отсутствии конфликта интересов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## Литература / Reference

1. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 28 февраля 2018 г. № 337-р «Об утверждении плана мероприятий («дорожной карты») «Развитие биотехнологий и геномной инженерии» на 2018–2020 годы». [Resolution of the Government of the Russian Federation of February 28, 2018, No. 337-r «Action plan for development of biotechnology and genetic engineering (roadmap) for 2018–2020» (In Russ.)]
2. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 5 мая 2018 г. № 870-р «Об утверждении плана мероприятий («дорожной карты») по совершенствованию законодательства и устранению административных барьеров в целях обеспечения реализации плана мероприятий («дорожной карты») Национальной технологической инициативы по направлению «Желснет» [Resolution of the Government of the Russian Federation of May 5, 2018, No. 870-r «Action plan for development and implementation of the «Healthnet» National technological initiative (roadmap)» (In Russ.)]
3. Перечень медицинских технологий, разрешенных к применению в медицинской практике на 30 декабря 2011 г. [List of medicinal technologies, authorized for medical practice for December 30, 2011 (In Russ.)] Available from: <http://www.roszdravnadzor.ru/archive/documents/12545>
4. Regulation (EC) No 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 November 2007 on Advanced Therapy Medicinal Products and Amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004. *Official Journal of the European Union*. 2007;50(L 324):121–37. Available from: [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/reg\\_2007\\_1394/reg\\_2007\\_1394\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/reg_2007_1394/reg_2007_1394_en.pdf)
5. Part 1271 Human cells, tissues, and cellular and tissue-based products (21CFR1271). Code of Federal Regulations Title 21. FDA; 2017.
6. Tiedemann G, Sethe S. Regulatory framework for cell and tissue based therapies in Europe. In: Steinhoff G, ed. *Regenerative medicine — from protocol to patient. 4. Regenerative therapies I*. 3rd ed. Switzerland: Springer; 2016. P. 21–33.
7. Zubov ДА, Васильев РГ, Оксимец ВМ, Родниченко АЕ, Злацкая АВ, Губарь ОС, Гордиенко ИМ. Результаты применения ткане-инженерного эквивалента кости: трехлетний период наблюдений. Материалы III национального конгресса по регенеративной медицине. *Гены и Клетки*. 2017;XII(3):100–1. [Zubov DA, Vasylyev RG, Oksimets VM, Rodnichenko AE, Zlatskaya AV, Gubar OS, Gordienko IM. The results of the application of tissue-engineering equivalent of the bone: a three-year observation period. Materials of the 3rd national congress on regenerative medicine. *Genes and Cells*. 2017;XII(3):100–1 (In Russ.)]
8. Васильев РГ, Грицык ВФ, Литвинова ЛС, Родниченко АЕ, Губарь ОС, Шуплецова ВВ и др. Постнатальные мультипотентные стволовые/прогениторные клетки — производные нервного гребня: трансляция в клиническую практику. Материалы III национального конгресса по регенеративной медицине. *Гены и Клетки*. 2017;XII(3):59. [Vasylyev RG, Griytsyov VF, Litvinova LS, Rodnichenko AE, Gubar OS, Shupletsova VV, et al. Postnatal Multipotent stem/progenitor cells — derivatives of nerve crest: translation into clinical practice. Materials of the 3rd national congress on regenerative medicine. *Genes and Cells*. 2017;XII(3):59 (In Russ.)]
9. Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy. U.S. Department of health and human services. FDA. CBER; 1998.

10. Guideline on human cell-based medicinal products (EMA/CHMP/410869/2006). EMA; 2007.
11. 21st Century cures act. Public law 114–255. 114th Congress, December 13, 2016. Available from: <https://www.congress.gov/114/plaws/publ255/PLAW-114publ255.pdf>
12. Expedited Programs for regenerative medicine therapies for serious conditions. U.S. Department of health and human services. FDA. CBER; 2017.
13. European Medicines Agency guidance for applicants seeking access to PRIME scheme (EMA/191104/2015). EMA; 2018.
14. Kasai M. Regulation of regenerative medicine in Japan. Advanced therapies workshop, centre of regulatory excellence, Duke-NUS Medical School, 17–19 July, 2017. Available from: [https://teamlead.duke-nus.edu.sg/vapfiles\\_ocs/core/core\\_apec\\_rhsc\\_coe\\_adv\\_therapies\\_wrkshp\\_regulate\\_regenerative\\_meds\\_japan/index5.html](https://teamlead.duke-nus.edu.sg/vapfiles_ocs/core/core_apec_rhsc_coe_adv_therapies_wrkshp_regulate_regenerative_meds_japan/index5.html)
15. Assessment Report. Zalmoxis (EMA/CHMP/589978/2016). EMA; 2016. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Public\\_assessment\\_report/human/002801/WC500212588.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002801/WC500212588.pdf)
16. Guideline on the risk-based approach according to annex I, part IV of Directive 2001/83/EC applied to advanced therapy medicinal products (EMA/CAT/CPWP/686637/2011). EMA; 2013.
17. Concept paper on the revision of the guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells (EMA/CAT/424191/2017). EMA; 2017.
18. Guideline on safety and efficacy follow-up and risk management of advanced therapy medicinal products (EMA/149995/2008 rev. 1). EMA; 2018.
19. Ridgway AA. The regulation of cell therapy products in Canada. *Biologicals*. 2015;43(5):406–9. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2015.05.013>
20. Food and drugs act (R.S.C., 1985, с. F-27). Health Canada; 2018. Available from: <http://laws-lois.justice.gc.ca/eng/acts/F-27/index.html>
21. Safety of human cells, tissues and organs for transplantation regulations (SOR/2007-118). Health Canada; 2018. Available from: <http://laws-lois.justice.gc.ca/eng/regulations/SOR-2007-118/index.html>
22. Therapeutic goods (excluded goods) Order No. 1 of 2011. Australian Government. Department of health. Therapeutic goods administration; 2011. Available from: <https://www.tga.gov.au/therapeutic-goods-excluded-goods-order-no-1-2011>
23. Trickett AE, Wall DM. Regulation of cellular therapy in Australia. *Pathology*. 2011;43(6):627–34. <https://doi.org/10.1097/PAT.0b013e32834b3cfa>
24. Pharmaceutical administration and regulations in Japan. Information on Japanese regulatory affairs. Regulatory information task force. Japan pharmaceutical manufacturers association; 2017. Available from: <http://www.jpma.or.jp/english/parj/pdf/2017.pdf>
25. Galli MC, Serabian M, eds. *Regulatory aspects of gene therapy and cell therapy products: a global perspective. Advances in experimental medicine and biology 871*. Springer; 2015.
26. Han E, Shin W. Regulation of cell therapy products in Korea. *ISBT Science series*. 2015;10(S1):129–33. <https://doi.org/10.1111/voxs.12158>
27. Sale of drugs act (chapter 282). Revised edition. Singapore: statutes of the republic of Singapore; 1985. Available from: [http://www.hsa.gov.sg/content/dam/HSA/HPRG/Useful\\_Information\\_for\\_Applicants/Legislation/SALE%20OF%20DRUGS%20ACT.pdf](http://www.hsa.gov.sg/content/dam/HSA/HPRG/Useful_Information_for_Applicants/Legislation/SALE%20OF%20DRUGS%20ACT.pdf)
28. Pharmaceutical affairs act. Republic of China (Taiwan): Ministry of Health and Welfare; 2018. Available from: <http://law.moj.gov.tw/Eng/LawClass/LawAll.aspx?PCODE=L0030001>
29. Medical care act. Republic of China (Taiwan): Ministry of Health and Welfare; 2018. Available from: <http://law.moj.gov.tw/Eng/LawClass/LawAll.aspx?PCODE=L0020021>
30. Chen YC, Cheng HF, Yeh MK. Cell therapy regulation in Taiwan. *Cell Transplant*. 2017;26(3):483–92. <https://doi.org/10.3727/096368916X693293>
31. 16th ICDRA recommendations. *WHO Drug Information*. 2014;28(3):298–306. Available from: [http://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/regulation\\_legislation/icdra/16\\_ICDRA\\_Recommendations2014.pdf](http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/regulation_legislation/icdra/16_ICDRA_Recommendations2014.pdf)
32. Постановление Совета Министров Республики Беларусь от 28 ноября 2014 г. № 1120 «О некоторых вопросах государственной регистрации биомедицинских клеточных продуктов». [Resolution of the council of ministers of the republic of Belarus of November 28, 2014, No. 1120 «On some issues of State registration of biomedical cell products» (In Russ.)] Available from: [http://pravo.by/upload/docs/op/C21401120\\_1417554000.pdf](http://pravo.by/upload/docs/op/C21401120_1417554000.pdf)

## Об авторах

**Мельникова Екатерина Валерьевна**, канд. биол. наук, главный эксперт лаборатории биомедицинских клеточных продуктов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0002-9585-3545>

**Горяев Артем Анатольевич**, канд. биол. наук, заместитель начальника управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0003-1620-6233>

**Савкина Мария Владимировна**, канд. биол. наук, эксперт 1 категории управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0002-8527-2157>

**Меркулова Ольга Владимировна**, канд. мед. наук, ведущий эксперт лаборатории биомедицинских клеточных продуктов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0001-7013-0394>

## Authors

**Ekaterina V. Melnikova**, Candidate of Biological Sciences, Chief Expert of the Laboratory of Biomedical Cell Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0002-9585-3545>

**Artem A. Goryaev**, Candidate of Biological Sciences, Deputy Head of the Division for Expert Evaluation of Antibacterial MIBPs of the Centre for Evaluation and Control of MIBPs' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0003-1620-6233>

**Maria V. Savkina**, Candidate of Biological Sciences, 1st Professional Category Expert of the Division for Expert Evaluation of Antibacterial MIBPs of the Centre for Evaluation and Control of MIBPs' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0002-8527-2157>

**Olga V. Merkulova**, Candidate of Medical Sciences, Leading Expert of the Laboratory of Biomedical Cell Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0001-7013-0394>

**Чапленко Александр Андреевич**, эксперт 2 категории лаборатории биомедицинских клеточных продуктов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-1176-4658>

**Рачинская Ольга Анатольевна**, канд. биол. наук, эксперт 1 категории лаборатории биомедицинских клеточных продуктов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8377-9205>

**Семенова Ирина Семеновна**, канд. биол. наук, эксперт 1 категории лаборатории биомедицинских клеточных продуктов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-9026-0508>

**Трусов Георгий Александрович**, эксперт 2 категории лаборатории биомедицинских клеточных продуктов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-8922-6342>

**Меркулов Вадим Анатольевич**, д-р мед. наук, профессор, заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Поступила 06.07.2018

Принята к публикации 09.08.2018

**Aleksandr A. Chaplenko**, 2nd Professional Category Expert of the Laboratory of Biomedical Cell Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-1176-4658>

**Olga A. Rachinskaya**, Candidate of Biological Sciences, 1st Professional Category Expert of the Laboratory of Biomedical Cell Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8377-9205>

**Irina S. Semenova**, Candidate of Biological Sciences, 1st Professional Category Expert of the Laboratory of Biomedical Cell Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-9026-0508>

**Georgy A. Trusov**, 2nd Professional Category Expert of the Laboratory of Biomedical Cell Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-8922-6342>

**Vadim A. Merkulov**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Deputy General Director for Medicinal Products Evaluation of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Received 6 July 2018

Accepted 9 August 2018

## Свиной трипсин в производстве биологических лекарственных препаратов. Риски и требования к безопасности

С. М. Суханова\*, Е. М. Петручук

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

Трипсин — реагент, широко применяемый в производстве биологических лекарственных препаратов (БЛП). До недавнего времени в качестве основного источника получения препаратов трипсина использовали поджелудочные железы крупного рогатого скота (КРС), свиней и птиц. Обнаружение в конце 80-х годов прошлого века у КРС заболевания, получившего название «трансмиссивная губчатая энцефалопатия» или «коровье бешенство», привело к необходимости ограничения использования данного источника. Учитывая потенциальную опасность использования трипсина, полученного от КРС, в производстве БЛП чаще стал применяться свиной трипсин. Получаемый из животного сырья, фермент может быть контаминирован цирковирuсами, парво- и пестивирuсами, микоплазмами, широко распространенными среди свиней. В связи с высокой устойчивостью к физико-химической обработке они представляют потенциальную опасность для реципиентов вакцин и других БЛП. Для предотвращения контаминации необходимо применять меры по снижению, выявлению и инактивации посторонних агентов как в исходных материалах, так и на стадиях производства БЛП. В обзоре рассмотрены наиболее распространенные виды контаминации трипсина, получаемого из поджелудочных желез свиней, способы ее выявления, снижения и устранения. Представлены сведения о российских и международных требованиях к качеству и безопасности свиного трипсина, используемого в производстве БЛП.

**Ключевые слова:** трипсин; биологические лекарственные препараты; культура клеток; активация вирусов; производство вакцин; анализ рисков; вирусная безопасность; цирковирuсы; парвовирuсы; микоплазмы

**Для цитирования:** Суханова СМ, Петручук ЕМ. Свиной трипсин в производстве биологических лекарственных препаратов. Риски и требования к безопасности. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2018;18(3):161–167. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-161-167>

\***Контактное лицо:** Суханова Светлана Михайловна; [SuhanovaSM@expmed.ru](mailto:SuhanovaSM@expmed.ru)

## Porcine Trypsin in the Manufacture of Biological Medicinal Products. Risks and Safety Requirements

S. M. Sukhanova\*, E. M. Petruchuk

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

Trypsin is a reagent widely used in the manufacture of biological medicinal products (BMPs). Until recently, pancreata of cattle, pigs and poultry were the main sources of trypsin preparations. The discovery of the disease called «transmissible spongiform encephalopathy» or «cow rabies» (TSE) in cattle in the late 1980s showed a clear need for limiting the use of this source. Given the potential risk of using trypsin obtained from cattle, porcine trypsin became more commonly used in the production of biological medicinal products. Enzymes obtained from raw materials of animal origin can be contaminated with circoviruses, parvo- and pestiviruses, and mycoplasmas that are common to pigs. Due to high resistance to physical and chemical treatment, these contaminants pose a potential risk to recipients of vaccines, as well as to other biological medicinal products. Prevention of contamination requires measures aimed at detection, reduction and inactivation of foreign agents, both in raw materials and during BMP production. The article considers the most common types of porcine trypsin contamination, methods of its detection, reduction and elimination. The article also contains information on the Russian and international requirements for the quality and safety of porcine trypsin used in the production of biological medicinal products.

**Key words:** trypsin; biological medicinal products; cell culture; virus activation; vaccine production; risk assessment; viral safety; circovirus; parvovirus; mycoplasma

**For citation:** Sukhanova SM, Petruchuk EM. Porcine trypsin in the manufacture of biological medicinal products. Risks and safety requirements. BИOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BИOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2018;18(3):161–167. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-161-167>

\***Corresponding author:** Svetlana M. Sukhanova; [SuhanovaSM@expmed.ru](mailto:SuhanovaSM@expmed.ru)

Биологические лекарственные препараты (БЛП) относятся к препаратам, в процессе производства которых могут использоваться материалы животного и человеческого происхождения. Серьезную проблему для безопасности биопрепаратов представляет возможная контаминация вирусами, бактериями, грибами, микоплазмами, источниками которой могут быть исходные материалы, питательные среды, сыворотка, трипсин и другие ингредиенты, используемые при производстве. Контаминация может изменить характер роста клеточных культур — субстрата производства и привести к изменению свойств биологического продукта. Учитывая потенциальные риски, технология производства, контроля и применения БЛП требует соблюдения особых мер предосторожности [1, 2].

Трипсин широко используется в производстве БЛП при культивировании клеточных линий. До недавнего времени в качестве основного источника получения препаратов трипсина, отвечающего требованиям квалификации «для культур клеток», использовали поджелудочные железы крупного рогатого скота (КРС), свиней и птиц [3, 4]. Обнаружение в конце 80-х годов прошлого века у КРС заболевания, получившего название «трансмиссивная губчатая энцефалопатия» (ТГЭ) или «коровье бешенство», привело к необходимости ограничения использования данного источника. Возбудители ТГЭ представляют собой аномальные, чрезвычайно устойчивые к разнообразным химическим и физическим воздействиям белки — прионы, вызывающие у людей болезнь Крейтцфельда — Якоба — губчатую дегенерацию коры головного мозга. Предполагают, что основной причиной заболевания является употребление мяса животных, болеющих ТГЭ, а также наследственный фактор, связанный с геном PrNP [5]. Кроме того, были отмечены случаи заражения пациентов в медицинских учреждениях через некачественно стерилизованные инструменты или трансплантируемые ткани. В настоящее время не существует валидированного метода, который может быть использован для биологических препаратов или для испытания клеточных линий на присутствие агентов ТГЭ. В связи с этим Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) для производства БЛП рекомендует использовать сырье из стран, классифицированных Всемирной организацией здоровья животных (ВОЗЖ) и Европейским ведомством по безопасности пищевых продуктов (ЕВБПП) как обеспечивающих незначительный риск или риск по губчатой энцефалопатии КРС категории III. Биологические фармацевтические субстанции и лекарственные препараты должны проходить контроль на содержание инфекционного прионного белка [3, 6, 7]. Для минимизации риска передачи агентов губчатой энцефалопатии посредством лекарственных препаратов для медицинского и ветеринарного применения научным комитетом Европейского агентства по оценке лекарственных средств (Committee for Proprietary Medicinal Products, CPMP) рекомендовано производителям отдавать предпочтение использованию материалов животных, относящихся к подотряду нежвачных (свинообразные) [8].

Принимая во внимание потенциальную опасность использования трипсина, полученного от КРС, в производстве БЛП чаще стал применяться свиной трипсин. Установление и оценка рисков, связанных с использованием этого сырья, требуют тщательного изучения.

Целью настоящей работы является анализ рисков при использовании свиного трипсина в производстве биологических лекарственных препаратов, а также обзор общих принципов, которые необходимо применять при оценке его качества и безопасности.

В задачи входило рассмотрение наиболее широко распространенных видов контаминации, способов ее выявления,

снижения и устранения, а также обобщение российских и международных требований к качеству свиного трипсина, используемого в производстве БЛП.

**Контаминация свиного трипсина.** В соответствии с национальными и международными требованиями источником получения свиного трипсина, предназначенного для использования в качестве реагента при производстве биологических лекарственных средств, должно служить сырье, полученное от свиней, признанных пригодными для употребления человеком в пищу на основании результатов их обследования до и после убоя. В Российской Федерации поджелудочные железы (ПЖ) необходимо получать от здоровых свиней, содержащихся в животноводческих хозяйствах в соответствии с системой правил, применяемых для обеспечения благоприятного эпизоотического статуса и предотвращения распространения заразных болезней. Партии ПЖ должны иметь четкую маркировку, позволяющую идентифицировать природу животной ткани, ее происхождение и дату сбора, а также соответствующие документы, выданные компетентными ветеринарными органами [3, 9]. Несмотря на регулярный контроль за безопасностью пищевых продуктов, существует риск того, что исходный материал, полученный от животных, может быть контаминирован посторонними агентами, особенно вирусами доноров, которые сложно удаляются из-за их высокой устойчивости к физико-химической обработке. Контаминация может изменять характер роста клеточных культур и свойства биологических продуктов, в связи с чем теоретически существует риск заражения реципиентов препаратов, а также гибели клеточного субстрата производства [9]. Наиболее серьезными проблемами для промышленных свиноккомплексов России и многих стран мира, приводящими к экономическим потерям, являются цирковирусная, парвовирусная, пестивирусная инфекции и энзоотическая пневмония (микоплазмоз) свиней [5, 10].

В 2010 г. появилось сообщение Victoria J.G. и соавт. [11] об обнаружении последовательностей ДНК цирковируса свиней в живой аттенуированной ротавирусной вакцине производства GlaxoSmith Kline Biologicals (Бельгия). В исследованном материале содержалось 98 % подлинного цирковируса свиного (PCV-1 или ЦВС-1). В дальнейшем загрязнение вакцины цирковирусом было подтверждено и показано, что его происхождение может быть связано с коммерческими партиями трипсина Difco, используемыми в производстве препарата [9, 11]. Эксперты Европейского Агентства по оценке лекарственных средств, проанализировав результаты секвенирования, пришли к выводу, что присутствие последовательностей ДНК цирковируса свиней, обнаруженных в живой аттенуированной ротавирусной вакцине, вводимой орально, не представляет риска для здоровья населения, так как данный тип вируса не вызывает заболевания у людей [11, 12].

Впервые цирковирус свиней, обозначенный как ЦВС-1 — нецитопатогенный контаминант, был обнаружен немецкими исследователями в 1974 г. в перевиваемой линии клеток почки поросенка PK-15. В 1998 г. в той же культуре были выделены новые антигенно родственные между собой штаммы, обозначенные как ЦВС-2. В отличие от ЦВС-1, ЦВС-2 вызывает у свиней тяжелые поражения лимфоузлов, селезенки, легких и почек. Цирковирус является одним из самых устойчивых вирусов к обработке дезинфектантами. Он не инактивируется 5 % раствором фенола в течение 2 ч, сохраняет инфекционность при pH 3,0–9,0 и температуре 37 °C в течение 1,5 ч, а также при нагревании до 80 °C в течение 15 мин. Только при кипячении в течение не менее 10 мин и после обработки 10 % раствором йода вирус инактивируется через 2 ч [10, 13].

В ряде стран мира с развитым свиноводством (Великобритания, Германия, Бельгия, Испания, Канада, США) при обследовании животных в 25–98 % случаев были найдены антитела к ЦВС-1. В нашей стране ЦВС-2 был выявлен в 2000 и 2008 гг., антитела к нему обнаружены почти во всех свиноводческих хозяйствах. Экономические потери, связанные с нарушениями репродуктивной функции у свиноматок, вызывающими аборт, мертворождение, гибель поросят вскоре после рождения, мумификацию, составляют 80–100 % [13, 14].

Похожие симптомы наблюдали при инфекции, вызываемой парвовирусом. Это заболевание, описанное в 1965 г. в США Дан и соавт. и названное СМЕДИ, характеризовалось рождением мертвых или нежизнеспособных поросят (still-birth), мумификацией плодов (mummified fetuses), гибелью эмбрионов (embryonic death) и бесплодием (infertility) (SMEDI). В России инфекция была выявлена в 1982 г. В естественных и экспериментальных условиях к парвовирусу чувствительны только свиньи [15, 16]. Вирус обладает тератогенной активностью, проходит через плаценту, вызывая у потомства деформации зубов и костей, образование расщелины губы и неба. Возбудитель устойчив к действию различных физико-химических факторов среды, сохраняет инфекционность при pH 3,0–9,0 и температуре 37 °C в течение 1,5 ч и после обработки 10–50 % растворами хлороформа и эфира в течение 10–30 мин. Инактивируется при 80 °C в течение 5 мин, чувствителен к УФ-излучению и действию 2–3 % растворов формалина и гидроксида натрия [15, 17]. Вследствие высокой устойчивости к воздействию физико-химических факторов среды парвовирусы представляют большую опасность как контаминанты клеточных культур и готовых БЛП. Предполагают, что источником контаминации парвовирусом свиней, выявленной в первичных культурах клеток почек, щитовидной железы и тестикул поросят, в перевиваемых культурах клеток свиней (ППК, РК-15, БТ) и человека (HeLa, Her-2, KB, FL-Amnion) является трипсин, полученный из ПЖ инфицированных свиней. Выделение парвовируса свиней из коммерческой партии трипсина подтверждает эту гипотезу и свидетельствует о высокой устойчивости вируса к действию различных факторов в процессе его получения [17].

Вирус классической чумы (КЧС) вызывает в популяции свиней эпидемии и отличается высокой патогенностью и смертностью среди поголовья (80–100 %) через 1–2 нед. после появления клинических признаков заболевания. В 1999 г. инфекция была зарегистрирована в хозяйствах Австрии, Албании, Болгарии, Германии, Китая, Латвии, Молдовы, России, Словакии, Словении, Хорватии, Чехии. Источником заболевания является вирус, относящийся к роду пестивирусов семейства Flaviviridae, который, накапливаясь в сосудах, костном мозге, лимфатических узлах, вызывает кровоизлияния, воспаления и некроз тканей и органов. Классическая чума свиней по Международной классификации заразных болезней животных относится к списку А особо опасных инфекций и наносит значительный экономический ущерб как в развивающихся странах, так и в странах с хорошо организованной системой мер безопасности. Заболевание характеризуется появлением у животных лихорадки постоянного типа, резким угнетением, отказом от корма, апатией, конъюнктивитом, появлением точечных или пятнистых кровоизлияний, паралича задних конечностей. Большое количество вируса выделяют животные, инфицированные высокоvirulentными штаммами КЧС, и поросята с врожденной инфекцией. Животные, перенесшие инфекцию, не представляют опасности в связи с образованием у них специфических антител. При хронической инфекции, вызванной низкоvirulentными штаммами,

поросята выделяют вирус непрерывно или периодически в течение всей жизни (2,5–11 месяцев) [18, 19].

Весьма ощутимый экономический ущерб свиноводческим комплексам приносит микоплазменная (энзоотическая) пневмония или респираторный микоплазмоз — хроническое заболевание, характеризующееся воспалением легких, серозных покровов и нарушением воспроизводительной функции у свиноматок. В некоторых хозяйствах микоплазмоз поражает до 30–50 % животных. Возбудителями заболевания могут быть *Mycoplasma suis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae*, *M. hyorhinis*, *M. granularum*, *M. fermentas*. Микоплазмы способны существовать в организме животных в анабиотическом состоянии длительное время, поэтому возбудители встречаются в большинстве популяций свиней [20, 21].

Для профилактики вирусных и микоплазменных инфекций свиней применяют как общие меры безопасности, так и вакцинацию здоровых животных, лечение антибиотиками, гипериммунными сыворотками и симптоматическими препаратами. Общие меры безопасности включают технологические, ветеринарно-санитарные, зооигиенические и зоотехнические мероприятия для оптимизации условий содержания, полноценное кормление и разрыв эпизоотической цепи. Особое внимание должно уделяться предотвращению и мониторингу инфекционных заболеваний у животных, ткани которых используются в качестве сырья [22].

В обзоре Marcus-Sekura С. и соавт. [23], посвященном анализу рисков при использовании контаминированного свиного трипсина, было сообщено о существовании 55 видов вирусов свиней, принадлежащих к 17 различным семействам, которые могут представлять опасность для человека. Данные были подтверждены сведениями о заражении человека в природных очагах, обнаружением антител в организме людей и/или способностью вирусов инфицировать культуры клеток животных и человека. Около 60 % этих вирусов могут реплицироваться в линии клеток почки африканской зеленой мартышки Vero, широко используемой для выращивания вирусных культур при производстве и тестировании БЛП [11, 23].

Наличие контаминации в свином трипсине требует от производителя проведения оценки потенциальных рисков, контроля готовых БЛП и использования в производстве дополнительных стадий для снижения вирусной нагрузки. Особенно актуальна эта задача для препаратов, в производственном цикле которых вирусная инактивация не проводится, например, для живых вакцин или для препаратов, тестирование которых на наличие контаминации на заключительных стадиях производственного цикла затруднено, например, при производстве лекарственных препаратов на основе культур клеток [9].

В связи с тем, что производство некоторых лекарственных препаратов невозможно без использования материалов животного происхождения, необходимо применять меры по снижению рисков их контаминации. В соответствии с требованиями Евразийского экономического союза (ЕАЭС) и Документов регуляторных органов Европейского экономического сообщества (ЕЭС) трипсин как реагент животного происхождения, используемый в производстве БЛП, должен быть изготовлен в рамках систем качества GMP (Надлежащая производственная практика), HACCP (Анализ опасностей и критических контрольных точек) и ISO (Система менеджмента безопасности и производства пищевой продукции). Производители и испытательные лаборатории должны обладать исчерпывающей информацией о безопасности трипсина и нести ответственность за то, чтобы тестирование проводилось в соответствии с требуемыми стандартами качества. Необходимо изучить эпидемиологическую

ситуацию, оценить состояние животных, от которых было получено сырье, подобрать наиболее чувствительные и эффективные методы для выявления, инактивации или элиминации возможных вирусных агентов, предусмотреть вероятность их попадания и размножения в используемые для производства культуры клеток. Если вирусная контаминация обнаружена, то партия трипсина не должна использоваться для производства БЛП до тех пор, пока тщательная оценка риска не будет свидетельствовать о том, что инфекционный агент надежно инактивирован или удален [8, 24].

**Тестирование трипсина** на наличие вирусов может проводиться поставщиком трипсина, изготовителем лекарственного средства и испытательной лабораторией. Тестирование исходных материалов или промежуточных продуктов на наличие вирусного заражения является важной мерой обеспечения безопасности БЛП. Стадии, на которых проводятся испытания, должны быть четко определены и оправданы. По экономическим и организационным причинам не представляется возможным проверить каждую поджелудочную железу до ее объединения, и материал от одного инфицированного животного может войти в большую производственную партию. Чувствительность последующих тестов в этом случае может оказаться недостаточной для выявления «разбавленного» загрязняющего агента в объединенном материале. Тестирование пула исходного материала на наличие контаминантов должно проводиться перед каждой стадией вирусной инактивации/элиминации, в то время как готовый препарат в некоторых случаях можно не проверять. Такие стадии производства трипсина, как спиртовая экстракция из замороженных тканей, нагревание или инкубирование при низком значении pH, могут привести к дезактивации ряда вирусов. Кроме того, благодаря собственной ферментативной активности трипсин способен инактивировать некоторые контаминанты, например ретровирусы [3]. Если эффективность вирусной инактивации, проведенной в процессе производства, доказана, то контроль на наличие искомых вирусов в готовом препарате может не проводиться [9].

Для выявления вирусной контаминации трипсина могут быть использованы методы исследования цитопатического действия (ЦПД) на клеточных культурах в системе *in vitro*, заражение чувствительных животных, серологические реакции гемагглютинации, гемадсорбции, флуоресцирующих антител (МФА), твердофазный метод иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих диагностикумов [25, 26]. Для проведения экспресс-анализа и скрининга готового препарата трипсина может применяться метод ПЦР (полимеразная цепная реакция) [9, 15].

В связи с тем что вирусы свиней, представляющие опасность для человека, могут реплицироваться в линии клеток Vero, используемой в производстве БЛП, рекомендуется проводить общий тест *in vitro* с использованием двух различных клеточных линий, одна из которых человеческого или обезьяньего происхождения, а другая должна быть получена от свиньи. Для индикации предполагаемых контаминирующих вирусов, обладающих гемадсорбирующими, гемагглютинирующими свойствами или вызывающими цитопатическое действие, необходимо отбирать наиболее чувствительные к ним клеточные линии [2, 9, 25].

Для выявления цирковирусов используют монослойные и органные культуры клеток кишечника эмбриона свиньи (КЭС), первичные и перевиваемые клетки почек эмбриона свиньи (ПЭС, СПЭВ), тестикулов поросенка (ТП), щитовидной железы свиньи (ЩС). Обнаружить цирковирусы также можно в культурах моноцитов/макрофагов, полученных из костного

мозга свиней, периферической крови, легких, лимфатических узлов и в перевиваемой культуре клеток сетчатки плода свиньи [13, 16]. Репродукция вируса в первичных и перевиваемых культурах клеток сопровождается развитием цитопатического эффекта (ЦПЭ), характеризующегося диффузной зернистостью, округлением клеток, отделением их от стекла и частичным или полным разрушением монослоя [27].

Вирус КЧС культивируется в первичных культурах клеток легких, селезенки, почки, тестикул и лейкоцитов свиней. В связи с тем что он не вызывает видимого ЦПД, его обнаруживают с помощью МФА, по ярко-зеленому свечению в цитоплазме инфицированных клеток. Идентификацию вируса КЧС проводят методами флуоресцирующих антител, иммуноферментного анализа или нейтрализации флуоресцирующих микробляшек [18].

Для обнаружения микоплазм применяют микробиологический метод (посев на питательные среды), метод индикаторной клеточной культуры (цитохимический) с использованием флуоресцирующего красителя ДНК. В качестве альтернативных могут быть использованы гистологические методы исследования, реакция связывания комплемента (РСК), метод ПЦР [22].

Наиболее трудно выявляется контаминация латентными вирусами, не вызывающими деструкции в клеточных культурах, для которых требуются дополнительные, более чувствительные и информативные тесты. В этих случаях рекомендуется использовать несколько чувствительных клеточных линий [23]. Специальные тесты на наличие вирусов свиней, которые не были обнаружены в ходе общего теста на клеточной культуре, должны быть определены для каждого конкретного случая после анализа типичных рисков для продукта, учитывая весь производственный процесс и способ применения БЛП [9]. Следует также учитывать соотношение риска и пользы при определении пригодности клеточного субстрата для производства конкретного препарата. При оценке риска необходимо следовать общим принципам, изложенным в Европейской фармакопее (ЕФ) [28]. Подробные рекомендации по вирусной безопасности, включая валидационные исследования, представлены, в частности, в Рекомендациях по вирусным валидационным исследованиям Комитета по патентованным лекарственным препаратам и Руководстве ICH Q5A: Оценка вирусной безопасности биотехнологических продуктов, полученных с использованием линий клеток человека или клеток животного происхождения [24, 29].

**Снижение контаминации.** Процесс производства трипсина, включающий высокоэффективные стадии очистки (спиртовое осаждение, высаливание, хроматография, длительная инкубация при низких значениях pH), должен надлежащим образом контролироваться не только в отношении сохранения активности ферментного препарата, но и отсутствия посторонних агентов. Основным способом, обеспечивающим безопасность трипсина, является удаление микробиологических агентов. Выбранные стадии производственного процесса должны быть тщательно валидированы и подтверждена их эффективность [9, 30]. Учитывая ограничения на проведение сплошного контроля сырья и тестирования на наличие вирусов, целесообразно включать специальную стадию для вирусной редуции. Для этой цели могут быть использованы УФ-С (коротковолновое) или гамма-облучение (45 кГр), нанофильтрация, обработка detergentами, преципитация, воздействие температуры и низких значений pH, хроматография. Данные методы обработки зарекомендовали себя как эффективные, значительно снижающие контаминацию, но не оказывающие при этом влияния на активность трипсина.

Гамма-лучи ( $\gamma$ -лучи), обладающие чрезвычайно малой длиной волны — менее  $2 \cdot 10^{-10}$  м и большой проникающей способностью, могут применяться для обработки лиофилизированных или замороженных жидких препаратов трипсина, вызывая разрывы водородных и ковалентных связей между нуклеиновыми кислотами и белковой оболочкой вируса. Что касается парвовирусов, то они обладают устойчивостью к воздействию рН и имеют относительно низкую чувствительность к гамма-облучению.

УФ-излучение обладает наиболее высокой энергией в интервале длин волн от 205 до 315 нм с максимумом при 265 нм. Под влиянием УФ-излучения происходят изменения в структуре нуклеиновых кислот вирусов. Вместе с тем  $\gamma$ - и УФ-излучение не оказывают существенного влияния на белковую оболочку, поэтому инактивированные вирусы сохраняют свою антигенную и иммуногенную активность. При применении  $\gamma$ - и УФ-облучения необходимо подбирать дозы таким образом, чтобы они были достаточно высокими для инактивации/элиминации вирусов и достаточно низкими для сохранения протеолитических свойств трипсина [3, 9].

Наиболее эффективным и надежным способом устранения контаминации является нанофильтрация. Для удаления вирусов применяют мембранные лабораторные фильтры Millipore с размером пор от 0,025 до 8 мкм, для удаления микоплазм — фильтры Durapore с размером пор от 0,1 до 5 мкм.

Для инактивации вирусов, покрытых липопротеиновой оболочкой, возможно использование неионных детергентов типа Тритон X-100 и Твин 80, под действием которых происходит дезинтеграция клеточных мембран и отделение от них вируса. Сложные или оболочечные вирусы инактивируются при низких значениях рН (4,0), а для безоболочечных вирусов этот метод необходимо совмещать с воздействием повышенной температуры.

Метод преципитации (осаждения) эффективен для удаления и капсидных, и некапсидных вирусов, в частности, парвовируса В19 с применением органических растворителей — этанола и трибутилового эфира, а также фосфорной кислоты. Возможно применение аффинной хроматографии с использованием голубого красителя (например, Blue Dye Sepharose, GE Healthcare, Швейцария) [31].

Документом ЕМА идентификацию и проверку активности свиного трипсина, используемого в производстве БЛП, рекомендовано проводить в соответствии с требованиями ЕФ. Трипсин, применяемый в качестве реагента для приготовления клеточных культур-субстратов и/или для активации вирусных частиц при производстве вакцин для медицинского применения, должен тестироваться на стерильность, отсутствие микоплазм и вирусов, особенно пестивирусов, цирковирусов и парвовирусов [9, 28].

Требования в Российской Федерации к трипсину, используемому в производстве и при контроле БЛП, согласуются с международными. Он не должен содержать микоплазм, цирко- и парвовирусов свиней, а также должен быть испытан на отсутствие контаминации бактериями и грибами [3, 26]. Испытание на стерильность и присутствие микоплазм проводят с помощью методов, изложенных в ОФС «Стерильность» и ОФС «Испытание на присутствие микоплазм» [32, 33].

### Использование альтернативных реагентов для культур клеток

В настоящее время дискутируется вопрос о замене, сокращении использования или исключении из производственного

процесса сырья, полученного от животных и людей. FDA (Food and Drug Administration, Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств) и EMA (European Medicines Agency, Европейское агентство по лекарственным препаратам) при работе с культурами клеток поддерживают использование аналогов свиного трипсина неживотного происхождения, таких как трипсиноподобные растительные и бактериальные протеазы или рекомбинантный трипсин [9].

В настоящее время трипсиноподобные протеазы получены из папаина, фицина, бромелаина, представителей родов *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* и микроскопических грибов родов *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* [34]. Компания Thermo Fisher Scientific, США предлагает аналог трипсина TrypLe™ — рекомбинантную грибную трипсиноподобную протеазу, которая не содержит компонентов животного происхождения, обладает высокой чистотой, щадящим воздействием на клетки и не уступает по показателям протеолитической и дезагрегирующей активности свиному трипсину. Препарат сохраняет свои свойства в течение 6 месяцев при температуре от 15 до 30 °С. Фирма Roche CustomBiotech (Швейцария) выпускает аналог трипсина, синтезированный рекомбинантными штаммами дрожжей *Pichia pastoris* с последовательностями аминокислот, идентичными таковым в трипсине животного происхождения. Использование рекомбинантных препаратов, полученных из бактерий или растений, в принципе сводит к минимуму риск заражения вирусами животных, и поэтому применение таких аналогов более предпочтительно. Однако не следует полагать, что применение рекомбинантного трипсина исключает риск контаминации биопрепаратов. Тем не менее никакие рекомендации по отказу от использования свиного трипсина в настоящее время не могут быть даны в связи с тем, что применение альтернативных реагентов в производстве БЛП требует тщательной оценки их пригодности, качества, стерильности, эффективности, а также других сопутствующих рисков [2, 3]. Существенным ограничением применения трипсиноподобных протеаз в производстве БЛП может быть и их стоимость, в десятки раз превышающая стоимость трипсина, полученного из животного сырья.

### Заключение

При использовании свиного трипсина существует риск того, что, несмотря на жесткие условия обработки, исходный материал для производства БЛП может быть загрязнен патогенной микрофлорой доноров. Среди наиболее широко распространенных возбудителей заболеваний свиней, поджелудочные железы которых служат источником трипсина, — цирковирусы, пестивирусы, парвовирусы и микоплазмы, представляющие потенциальную угрозу для потребителей как возможные контаминанты вакцин и других биологических лекарственных препаратов. В соответствии с национальными и международными требованиями к безопасности биопрепаратов для предотвращения контаминации необходимо использовать меры по выявлению и инактивации посторонних агентов как в исходных материалах, так и на этапах производства БЛП. Для обнаружения вирусов свиней могут быть использованы методы исследования ЦПД, реакции гемагглютинации, гем-адсорбции, МФА, ИФА, ПЦР. Удаление цирковирусов и парвовирусов представляет значительные трудности вследствие их высокой устойчивости к физико-химической обработке и требует проведения дополнительных этапов инактивации. Для инактивации резистентных вирусов наиболее эффективно использование УФ-С или гамма-облучения, нанофильтрации, хроматографии, обработки детергентами, рН, преципитации,

воздействия температуры. Трипсин, используемый в качестве реагента для приготовления клеточных культур-субстратов и/или для активации вирусных частиц при производстве вакцин для медицинского применения, должен также соответствовать тесту на стерильность и быть свободным от микоплазм.

Перед применением в производстве БЛП аналогов трипсина необходимо их тщательное изучение в отношении оценки пригодности, эффективности, отсутствия токсичности, а также сопутствующих рисков, вызванных контаминацией специфическими посторонними агентами, в отношении которых могут отсутствовать доказательства или средства для их обнаружения.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

**Acknowledgments.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00023-18-02 and was supported by the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590046-9).

**Информация об отсутствии конфликта интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## Литература / References

1. Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». [Federal law of the Russian Federation of April 12, 2010, No. 61-FZ «On circulation of medicines» (In Russ.)]
2. Recommendations for the Evaluation of Animal Cell Cultures as Substrates for the Manufacture of Biological Medicinal Products and for the Characterization of Cell Banks. *WHO Technical Report*. Series 978, Annex 3; 2013.
3. Суханова СМ, Петручук ЕМ, Генералов АА. Трипсин. Свойства и применение в производстве биологических лекарственных препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(2):106–13. [Sukhanova SM, Petruchuk EM, Generalov AA. Trypsin. Properties and Use in the Production of Biological Medicinal Products. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(2):106–13 (In Russ.)]
4. Попова ВМ, Кочиш ИИ, Беро ИЛ, Самуйленко АЯ, Гуславский АИ. Разработка и оптимизация биотехнологий производства ветеринарных препаратов и ферментов. *Сельскохозяйственная биология*. 2010;(4):45–50. [Popova VM, Kochish II, Bero IL, Samuilenko AY, Guslavskii AI. Development and optimization of biotechnology of manufacturing of veterinary preparation and enzymes. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya = Agricultural Biology*. 2010;(4):45–50 (In Russ.)]
5. Гребенникова ТВ. Современные аспекты диагностики прионных болезней. *Симпозиум «Фундаментальные и прикладные исследования в области инфекционных болезней, эпидемиологии и микробиологии»*. Сочи; 2016. [Grebennikova TV. Modern aspects of diagnosis of prion diseases. *Symposium «Basic and Applied Research in the Range of Infectious Diseases, Epidemiology and Microbiology»*. Sochi; 2016 (In Russ.)] Available from: <http://ia-ri.ru/upload/iblock/ff8/ff85571904332a82859b870740670bc2.pdf>
6. Note for Guidance on Minimising the Risk of Transmitting Animal Spongiform Encephalopathy Agents via Human and Veterinary Medicinal Products (EMA/410/01 rev. 3). EMA; 2011.
7. 5.2.8. Minimising the Risk of Transmitting Animal Spongiform Encephalopathy Agents Via Human and Veterinary Medicinal Products. European Pharmacopoeia 9.0.

8. Guideline on the Use of Bovine Serum in the Manufacture of Human Biological Medicinal Products (EMA/CHMP/BWP/457920/2012). European Medicines Agency; 2013.
9. Guideline on the Use of Porcine Trypsin Used in the Manufacture of Human Biological Medicinal Products (EMA/CHMP/BWP/814397/2011). EMA; 2014.
10. Сатина ТА. *Цирковирусные инфекции свиней: обзор литературы*. Владимир: ФГУ ВНИИЗЖ; 2003. [Satina TA. *Porcine Circovirus Diseases: Literature review*. Vladimir: FGU VNIIZZH; 2003 (In Russ.)]
11. Victoria JG, Wang C, Jones MS, McLoughlin K, Gardner S, Delwart EL. Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus. *J Virol*. 2010;84(12):6033–40. <https://doi.org/10.1128/JVI.02690-09>
12. European Medicines Agency Confirms that Presence of Unexpected Viral DNA in Live Attenuated Vaccines Does not Raise Public Health Concerns. Press release (EMA/732522/2010). EMA; 2010.
13. Бутенков АИ. Патогенетическое обоснование развития и прогнозирования течения цирковирусной инфекции у поросят: дис. ... д-ра вет. наук. Новочеркасск; 2010. [Butenkov AI. Pathogenetic substantiation of the development and prediction of the severity of the course of circovirus infection in piglets. Dr. Vet. Sci. [dissertation]. Novocherkassk; 2010 (In Russ.)]
14. Семенов ВИ, Болоцкий ИА, Васильев АК, Пруцаков СВ. Цирковирусные болезни свиней (ЦВБС). *Ветеринария Кубани*. 2009;(5):8–10. [Sementsov VI, Bolotsky IA, Vasilyev AK, Prutsakov SV. Porcine circovirus diseases (PCVD). *Veterinariya Kubani*. 2009;(5):8–10 (In Russ.)]
15. Орлянкин БГ, Сергеев ВА, Седов ВА. Парвовирусная болезнь свиней. *Ветеринария*. 1987;10:72–6. [Orlyankin BG, Sergeev VA, Sedov VA. Porcine Parvovirus Infection. *Veterinariya*. 1987;10:72–6 (In Russ.)]
16. Brown TT Jr, Paul PS, Mengeling WL. Response of conventionally raised weanling pigs to experimental infection with a virulent strain of porcine parvovirus. *Am J Vet Res*. 1980;41(8):1221–4.
17. Ерофеев СГ. Парвовирусная инфекция свиней: эпизоотология, диагностика и специфическая профилактика: дис. ... канд. вет. наук. Владимир; 2002. [Erofeev SG. Porcine parvovirus infection: epizootology, diagnosis and specific prophylaxis. Cand. Vet. Sci. [dissertation]. Vladimir; 2002 (In Russ.)]
18. Сидоров МА, Крупальник ВЛ. Чума свиней. В кн.: Бессарабов ВФ, Вашутин АА, Воронин ЕС. *Инфекционные болезни животных*. М.: КолосС; 2007. С. 362. [Sidorov MA, Krupalnik VL. Swine Fever. In: Bessarabov VF, Vashutin AA, Voronin ES. *Infectious Diseases of Animals*. Moscow: KolosS; 2007. P. 362 (In Russ.)]
19. Род пестивирусов. *Медицинский справочник 4medical.in*; 2012. [Pestiviruses. *Medical Guide 4medical.in*; 2012 (In Russ.)] Available from: <http://4medical.in/rod-pestivirusov/>
20. Жонголович АЕ. Этио-эпизоотологические особенности микоплазмоза свиней и усовершенствование методов его диагностики и лечения: дис. ... канд. вет. наук. Омск; 2008. [Zhongolovich AE. Ethio-epizootological features of swine mycoplasmosis and improvement of methods of its diagnosis and treatment. Cand. Vet. Sci. [dissertation]. Omsk; 2008 (In Russ.)]
21. Ефанова ЛИ, Степанов АВ, Свиридов ММ, Манжурина ОА. Микоплазменная инфекция у свиней. *Достижения науки и техники АПК*. 2012;(1):35–6. [Efanova LI, Stepanov AV, Sviridov MM, Manzhurina OA. Mycoplasma infection in pigs. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2012;(1):35–6 (In Russ.)]
22. Титов МА, Караулов АК, Шевцов АА, Бардина НС, Гуленкин ВМ, Дудников СА. *Методические рекомендации по оценке безопасности на свиноводческих предприятиях в Российской Федерации*. Владимир; 2010. [Titov MA, Karaulov AK, Shevtsov AA, Bardina NS, Gulen-

- kin VM, Dudnikov SA. *Methodological recommendations for the assessment of safety in pig farming enterprises in the Russian Federation*. Vladimir; 2010 (In Russ.)]
23. Marcus-Sekura C, Richardson JC, Harston RK, Sane N, Sheets RL. Evaluation of the human host range of bovine and porcine viruses that may contaminate bovine serum and porcine trypsin used in the manufacture of biological products. *Biologicals*. 2011;39(6):359–69. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.08.003>
  24. Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза (утв. Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 77). [Rules of Good Manufacturing Practice of the Eurasian Economic Union (app. by the Council of the Eurasian Economic Commission of November 3, 2016 No. 77) (In Russ.)]
  25. Шалунова НВ, Меркулов ВА, Комратов АВ, Петручук ЕМ, Семенова ИС, Волгин АР, Трусов ГА. Требования к клеточным культурам, используемым для производства и контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2013;(1):28–32. [Shalunova NV, Merkulov VA, Comratov AV, Petrushuk EM, Semenova IS, Volgin AR, Trousov GA. Requirements for cell cultures, used for manufacture and quality control of immunobiological medicines. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2013;(1):28–32 (In Russ.)]
  26. Общая фармакопейная статья 1.7.2.0011.15 Требования к клеточным культурам — субстратам производства иммунобиологических лекарственных препаратов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2, М.; 2015. [General monograph 1.7.2.0011.15 Requirements for cell cultures — substrates for the production of immunobiological drugs. The State Pharmacopoeia of Russian Federation 13th ed. V. 2. Moscow; 2015 (In Russ.)]
  27. Петрова ОГ, Донник ИМ, Исаева АГ, Крысенко ЮГ. Диагностика цирковирусной инфекции свиней. *Аграрный вестник Урала*. 2014;(3):27–31. [Petrova OG, Donnik IM, Isaeva AG, Krysenko YuG. Diagnostics of circovirus infection of pigs. *Agrarnyj vestnik Urala = Agrarian Bulletin of the Urals*. 2014;(3):27–31 (In Russ.)]
  28. 01/2011:0694 Trypsin. European Pharmacopoeia 9.0.
  29. 5.1.7. Viral safety. European Pharmacopoeia 9.0.
  30. Note for Guidance on Virus Validation Studies: The Design, Contribution and Interpretation of Studies Validating the Inactivation and Removal of Viruses (CPMP/BWP/268/95). EMA; 1996.
  31. Гусаров ДА. Разработка научных основ создания технологии выделения и очистки генно-инженерных белков: дис. ... д-ра хим. наук. М.; 2014. [Gusarov DA. Development of scientific bases of technology of isolation and purification of genetically engineered proteins. Dr. Chem. Sci. [dissertation]. Moscow; 2014 (In Russ.)]
  32. Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1, М.; 2015. [General monograph 1.2.4.0003.15 Sterility. The State Pharmacopoeia of Russian Federation 13th ed. V. 1. Moscow; 2015 (In Russ.)]
  33. Общая фармакопейная статья 1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2, М.; 2015. [General monograph 1.7.2.0031.15 Test for the presence of mycoplasma. The State Pharmacopoeia of Russian Federation 13th ed. V. 2. Moscow; 2015 (In Russ.)]
  34. Производство протеолитических ферментных препаратов. [Manufacture of proteolytic enzyme preparations (In Russ.)] Available from: [https://vuzlit.ru/716933/proizvodstvo\\_proteoliticheskikh\\_fermentnyh\\_preparatov](https://vuzlit.ru/716933/proizvodstvo_proteoliticheskikh_fermentnyh_preparatov)

#### Об авторах

**Суханова Светлана Михайловна**, канд. биол. наук, начальник лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6621-4384>

**Петручук Елена Мидатовна**, канд. биол. наук, эксперт 1 категории лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-7893-4933>

Поступила 11.05.2018  
Принята к публикации 09.08.2018

#### Authors

**Svetlana M. Sukhanova**, Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Bacteriological Culture Media and Cell Cultures of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6621-4384>

**Elena M. Petrushuk**, Candidate of Biological Sciences, 1st Professional Category Expert of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-7893-4933>

Received 11 May 2018  
Accepted 9 August 2018

## Рекомендации по изложению методики оценки биологической (специфической) активности биотехнологических лекарственных препаратов в нормативной документации

О. В. Головинская\*, С. Л. Лыскова, Ю. Н. Лебедева, Н. А. Алпатова, А. А. Мовсесянц, В. А. Меркулов

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

К биотехнологическим лекарственным препаратам, как и к другим лекарственным средствам, предъявляются требования эффективности, безопасности и качества. Оценка качества лекарственных средств включает экспертизу методов контроля качества лекарственного средства (проекта нормативной документации), лабораторную экспертизу качества образцов с использованием этих методов, а также экспертизу материалов регистрационного досье, включая материалы по валидации методик, представленных в проекте нормативной документации. Одним из наиболее значимых показателей качества биотехнологических лекарственных препаратов является биологическая активность, т.е. специфическая способность препарата вызывать определенный биологический эффект. Приведены результаты детального анализа методик определения биологической (специфической) активности, изложенных в проектах нормативной документации на различные биотехнологические лекарственные препараты. Целью работы было показать важность качественного изложения методик оценки биологической (специфической) активности биотехнологических лекарственных препаратов и ознакомить специалистов, ответственных за составление нормативной документации, с основными подходами к изложению раздела «Биологическая (специфическая) активность». В результате анализа нормативной документации сформулированы часто встречающиеся ошибки и упущения, рассмотрены общие замечания к описанию методик, приведена общая схема раздела «Биологическая (специфическая) активность» с подробными рекомендациями по содержанию подразделов. Совершенствование качества изложения информации в нормативной документации позволит сократить количество запросов экспертной организации на предоставление дополнительных документов и данных и обеспечит выполнение лабораторной фармацевтической экспертизы на должном уровне и в установленные сроки.

**Ключевые слова:** биотехнологические лекарственные препараты; оценка качества лекарственных препаратов; лабораторная экспертиза; изложение методик; нормативная документация; биологическая активность; специфическая активность

**Для цитирования:** Головинская ОВ, Лыскова СЛ, Лебедева ЮН, Алпатова НА, Мовсесянц АА, Меркулов ВА. Рекомендации по изложению методики оценки биологической (специфической) активности биотехнологических лекарственных препаратов в нормативной документации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2018;18(3):168–174. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-168-174>  
**Контактное лицо:** Головинская Ольга Вячеславовна; [golovinskaya@expmed.ru](mailto:golovinskaya@expmed.ru)

## Recommendations for Expounding Evaluation of Biological (Specific) Activity of Biotechnological Products in Product Specification Files

O. V. Golovinskaya\*, S. L. Lysikova, Yu. N. Lebedeva, N. A. Alpatova, A. A. Movsesyants, V. A. Merkulov

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

Biotechnological products, like all other medicinal products, have to comply with efficacy, safety and quality requirements. Quality evaluation of medicines includes assessment of test methods used to control medicinal product quality (described in product specification files provided by the manufacturer), laboratory testing of samples using these methods, as well as assessment of the registration dossier materials, including materials on test method validation included into the product specification files. One of the most important quality parameters of biotechnological products is biological activity, i.e. specific ability of a product to induce a desired biological effect. The article presents the results of a detailed analysis of methods used for determination of biological (specific) activity that are described in product specification files of various biotechnological products. The aim of the study was to demonstrate the importance of proper presentation of methods used for assessment of biological (specific) activity of biotechnological products and familiarise specialists engaged in elaboration of product specification files with the principles of presenting data in the «Biological (specific) safety» section. The analysis of documentation helped summarise the most common mistakes and omissions, formulate general recommendations concerning the description of methods, develop a general structure of the «Biological (specific) safety» section with detailed guidance on what to include in each of the subsections. Rationalisation of information presented

in this part of the product specification files will help reduce the number of expert body's requests for additional information/documents and will help ensure that laboratory testing is performed at a high professional level and within a prescribed period of time.

**Key words:** *biotechnological products; evaluation of medicinal product quality; laboratory testing; presentation of methods; product specification file; biological activity; specific activity*

**For citation:** *Golovinskaya OV, Lysikova SL, Lebedeva YuN, Alpatova NA, Movsesyants AA, Merkulov VA. Recommendations for expounding evaluation of biological (specific) activity of biotechnological products in product specification files. BИOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BИOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2018;18(3):168–174. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-168-174>*

**Corresponding author:** Olga V. Golovinskaya; [golovinskaya@expmed.ru](mailto:golovinskaya@expmed.ru)

В настоящее время в клинической практике широко используются биотехнологические лекарственные препараты (БЛП) — сложные препараты белковой природы, полученные с использованием технологии рекомбинантной ДНК, гибридного метода и метода моноклональных антител (цитокины, растворимые рецепторы и их антагонисты, факторы свертывания крови, моноклональные антитела, гормоны, ферменты, белки слияния) [1]. Разработка указанных препаратов является одним из наиболее перспективных направлений в области создания лекарственных средств, воздействующих на патогенетически значимые звенья в развитии заболевания, а к их качеству предъявляются серьезные требования.

Для оценки качества БЛП Федеральным законом № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» предусмотрена комбинация биологических и физико-химических методов [2]. Результаты оценки физико-химических показателей БЛП (подлинность, содержание родственных соединений и примесей, молекулярно-массовое распределение и др.) не являются достаточными для прогнозирования проявлений их биологической активности. Оценка специфической биологической активности, в свою очередь, позволяет количественно охарактеризовать механизм фармакологического действия препарата с помощью методов, выполняемых в условиях *in vitro* и *in vivo*. Это свидетельствует о высокой важности показателя «специфическая активность» и необходимости точного его определения при экспертизе качества БЛП [3, 4].

Основными задачами лабораторной экспертизы качества лекарственных средств являются оценка воспроизводимости предложенных методик и оценка качества образцов лекарственного средства с использованием этих методик [2, 5]. Следует отметить, что подтвердить качество лекарственного средства по какому-либо показателю в случае невозможности методики оценки качества невозможно.

В данном случае воспроизводимостью является частным случаем прецизионности (а именно, межлабораторной прецизионности) и заключается в необходимости получения экспертом приемлемых результатов испытания путем пошагового повторения методики в точном соответствии с описанием, приведенным в проекте нормативной документации (НД), в рамках лабораторной экспертизы с использованием представленных заявителем образцов [5–7].

Целью работы было отразить важность качественного изложения методик оценки биологической (специфической) активности биотехнологических лекарственных препаратов и ознакомить специалистов, ответственных за составление нормативной документации, с основными подходами к изложению раздела «Биологическая (специфическая) активность».

Методики определения биологической (специфической) активности отличаются не только разнообразием и уникальностью, но и особой чувствительностью к изменению внешних условий, что обусловлено использованием в испытаниях биологических объектов (культур клеток, вирусов, животных

и др.) [4]. На воспроизводимость биологической методики могут оказывать влияние следующие факторы:

- условия восстановления клеточной культуры или штамма индикаторного вируса;
- концентрации клеточной суспензии или суспензии индикаторного вируса, используемые в испытании;
- число пассажей культуры клеток до момента использования в испытании;
- периодичность и условия пересевов при рутинном культивировании;
- жизнеспособность клеток на момент использования в испытании;
- условия и продолжительность хранения клеточной суспензии или суспензии индикаторного вируса до момента использования в испытании;
- условия и продолжительность хранения питательных сред и растворов до момента использования в испытании;
- продолжительность и условия инкубаций на разных этапах проведения испытания;
- диапазон и шаг разведений образцов;
- линия, возраст, пол, масса тела и условия содержания лабораторных животных и т.д. [4].

Учитывая особую чувствительность биологических объектов, для признания биологической методики пригодной для предполагаемого использования (оценки специфической активности БЛП), ее валидационные характеристики должны быть тщательно изучены и описаны производителем.

Однако даже валидированная методика может оказаться невозможной на этапе экспертизы предложенных методик контроля качества лекарственного средства и качества представленных образцов лекарственного средства с использованием этих методик по причине ненадлежащего изложения методики в нормативной документации.

#### Общие замечания к изложению методик в нормативной документации

К общим проблемам, с которыми сталкивается эксперт при анализе нормативной документации, относятся следующие.

1. Некачественный перевод с потерей смысла или подменой понятий не только мешает восприятию текста и отвлекает от его сути, но и является причиной ложной трактовки приведенной информации. Например, перевод фразы «готовят десятикратный раствор 10X» как «готовят десятикратное разведение» или фразы «разведение в четыре этапа (шага)» как «четырёхкратное разведение» могут привести к приготовлению растворов и разведений с неверными концентрациями и, как следствие, получению неприемлемого результата испытания.

Именно поэтому методика должна быть изложена стилистически грамотно, проверена на наличие ошибок и опечаток, связанных с правописанием и пунктуацией, слова в предложениях должны согласовываться друг с другом. Перевод должен быть выполнен профессионально, недвусмысленно, объектив-

но, в точном соответствии со всеми специальными инструкциями, содержащимися в методиках проведения испытания. Замена специальных терминов некорректными, синонимичными и/или неспециальными словами недопустима.

2. Несоблюдение четкой структуры и последовательности изложения методики. Несмотря на то что существуют общие правила составления НД, обязательные для всех разделов [5, 8], некоторые значимые подразделы, такие как «Реактивы», «Оборудование», «Критерии пригодности системы» и т.п., часто отсутствуют, а информация, которая должна содержаться в этих подразделах, приводится в тексте других подразделов (например, «Смешивают 500 мл среды RPMI 1640 (НПО «ПанЭко» кат. № С330п или аналогичной) и 55 мл раствора фетальной бычьей сыворотки (GIBCO, кат. № 16141-061 или аналогичной)»), перегружая текст и затрудняя восприятие информации, или не приводится вовсе.

3. Еще одним упущением составителей НД является нелогичное и бессистемное описание этапов проведения испытания. Методика должна быть структурирована, изложена последовательно, в строгом соответствии с процедурой испытания, без пропуска существенных этапов и подразделов.

4. Употребление различных наименований для одного и того же образца/вещества/раствора и т.п. Так, стандартный образец в рамках одной методики не должен быть обозначен разнообразными терминами или синонимами («референс-образец», «референс-контроль», «эталонный образец», «контроль проб»), так как это приводит к путанице с образцами. При составлении НД следует соблюдать единообразие: если для какого-либо образца/вещества/раствора и т.п. в начале методики принята конкретная формулировка, то именно эта формулировка должна употребляться на протяжении всего текста раздела.

5. Аббревиатуры, сокращения и размерности величин. Несмотря на то что правила сокращения слов и обозначения размерностей величин являются общепринятыми, не все составители НД их придерживаются. Поэтому особо отметим некоторые из них.

Во-первых, каждое буквенное обозначение и сокращение должно быть расшифровано при первом упоминании в тексте.

Во-вторых, написание аббревиатур и сокращений должно быть унифицировано в пределах одного раздела. Если для стандартного образца при первом упоминании принято сокращение «СО», то другие сокращения («St», «RS») не должны встречаться в тексте раздела.

В-третьих, сокращения должны быть однозначными, т. е. одно и то же сокращение не должно применяться к разным наименованиям. Например, «фосфатидилхолин» обозначается как «РС» (сокращенно от латинского «*phosphatidylcholine*»), но и ростовая среда имеет буквенное обозначение «РС». Совершенно очевидно, что подобные сокращения не должны встречаться в пределах одного раздела, поскольку могут привести к подмене понятий.

В-четвертых, единицы измерения величин должны быть обозначены общепринятыми символами. Например, размерность величины специфической активности некоторых лекарственных препаратов следует указывать как «млн МЕ/мл» вместо «ММЕ/мл».

6. Включение в НД информации, касающейся проведения испытания на производстве, переписывание стандартных операционных процедур. Например, фраза «Проводят четыре анализа при выпускающем контроле и дополнительном анализе, и не менее двух — при испытании на стабильность» является лишней, перегружает текст раздела, а главное — не содержит

информации о том, сколько анализов необходимо провести на этапе экспертизы качества.

7. Небрежное, неграмотное составление раздела. Если грамматические, пунктуационные и стилистические ошибки, некачественно форматированный текст, содержащий лишние знаки и символы, перечисление реактивов и материалов, не используемых в испытании, ошибочное дублирование информации лишь затрудняют восприятие текста, то опечатки в цифровых обозначениях («10 мг/мл» вместо «100 мг/мл») или в обозначениях единиц измерения («мг» вместо «мкг») могут привести к невоспроизводимости методики.

Особое внимание также следует уделять информации о производителях и каталожных номерах реактивов и материалов: она должна быть проверена на опечатки и актуализирована.

### Рекомендации по изложению методик оценки биологической (специфической) активности

Правила составления и оформления НД в данной статье затрагиваться не будут, поскольку они подробно отражены в «Руководстве по экспертизе лекарственных средств», однако следует отметить, что текст должен быть оформлен в едином стиле с сохранением многоуровневой иерархической структуры заголовков на протяжении всего документа [8].

Далее будут рассмотрены основные рекомендации по структуре и последовательности изложения методик раздела «Биологическая (специфическая) активность» в НД на БЛП.

1. Название раздела.
2. Подраздел «Норма».

Важно, чтобы значение, размерность и формулировка требований, приведенных в подразделе «Норма» в тексте раздела, были идентичны требованиям, указанным в спецификации. Также стоит обратить внимание на то, что для содержания определяемого вещества (количественного определения активности) следует указывать не только нижнюю, но и верхнюю границы нормы.

3. Подраздел «Принцип метода».

Содержит краткое описание сути методики и механизма действия лекарственного препарата.

4. Подраздел «Оборудование».

В перечне оборудования перечисляются наименования всех устройств и приборов, участвующих в испытании, в том числе аналитические весы для приготовления навесок реактивов, рН-метр для определения рН буферных растворов, холодильники, поддерживающие определенный диапазон температур, для хранения образцов, стандартов и реактивов.

Для каждого прибора указывается производитель и актуальная (не устаревшая) модель, а также приводится уточнение «или аналогичный» там, где это применимо.

Если для какого-либо из перечисленного оборудования замена недопустима, это необходимо отразить дополнительно.

Если использование аналогов применимо для всего перечисленного оборудования, допустимо приведение примечания к подразделу с формулировкой «В испытании может быть использовано аналогичное оборудование».

Если для обработки результатов испытания предусмотрено использование какого-либо программного обеспечения, указываются его наименование и версия, а также приводится указание о возможности использования аналогичных программ для статистической обработки (если применимо).

Перечень оборудования рекомендуется представлять сплошным списком, пронумеровав для облегчения восприятия информации.

5. Подраздел «Материалы».

Перечень материалов содержит наименования всех материалов, используемых в испытании. Для каждого материала указывается производитель и актуальный каталожный номер, а также приводится уточнение «или аналогичного качества» там, где это применимо.

Если для какого-либо из перечисленных материалов замена недопустима (например, планшеты для испытания, пробирки, обработанные антикоагулянтом, и т.п.), это необходимо отразить дополнительно.

Если использование аналогов применимо для всех перечисленных материалов, допустимо приведение примечания к подразделу с формулировкой «В испытании могут быть использованы материалы аналогичного качества».

Если в испытании участвуют несколько видов планшетов, в перечне материалов следует указать их назначение, например, «планшеты для культивирования», «планшеты для приготовления разведений», «планшеты для анализа (проведения испытания)».

Рекомендуется также достаточно подробно перечислить характеристики специфических материалов, например, для планшетов целесообразно указать не только количество лунок, но и форму дна лунки, объем лунки, цвет планшета / дна лунок, наличие или отсутствие крышки, стерильный/нестерильный, обработанный/необработанный.

Перечень материалов рекомендуется представлять сплошным списком, пронумеровав материалы для облегчения восприятия информации.

6. В подразделе «Реактивы» перечисляются наименования всех реагентов, участвующих в испытании, в том числе веществ, используемых для доведения pH буферных растворов. Наименования следует приводить полностью, без упущений, например «3,3',5,5'-Тетраметилбензидина гидрохлорид» вместо «Тетраметилбензидин» и т.п. Для каждого реактива указывается производитель и актуальный каталожный номер, а также приводится уточнение «или аналогичного качества» там, где это применимо.

Если для какого-либо из перечисленных реактивов замена недопустима (специфические реактивы), это необходимо отразить дополнительно.

Если использование аналогов применимо для всех перечисленных реактивов, допустимо приведение примечания к подразделу с формулировкой «В испытании могут быть использованы реактивы аналогичного качества».

Перечень реактивов рекомендуется представлять единым списком, не подразделяя его по этапам испытания или по группам для приготовления, например, питательной среды, буферного раствора и т.п., так как один и тот же реактив может использоваться в испытании несколько раз, таким образом, будет перечислен дважды или трижды в разных группах или на разных этапах, что приведет к путанице с реактивами и неоправданному увеличению объема раздела.

Не следует указывать в перечне некоммерческие реактивы, описание приготовления которых приведено далее в тексте, однако, если допустимо альтернативное использование готовых к применению каталожных реактивов вместо их приготовления из отдельных компонентов (например, для фосфатно-солевого буферного раствора, фосфатно-солевого буферного раствора Дюльбекко и т.п.), в общем перечне реактивов рекомендуется перечислить как составные компоненты растворов с указанием производителя и каталожного номера, так и готовые к применению растворы с указанием производителя и каталожного номера. Для готовых к приме-

нению растворов уточнить: «может быть использован вместо реактивов п.п... — п.п...».

Если реактив является стандартом/реагентом фирмы-производителя (например, антитела, конъюгат, контрольный образец и т.п.), следует привести уточнение «реагент фирмы / стандарт фирмы» или «поставляется фирмой». Для реагентов фирмы указывается наименование, концентрация (активность), условия хранения (срок годности должен быть указан в сертификате качества на реагент), условия размораживания (если применимо), процедура восстановления из лиофилизованного состояния (если применимо), условия и продолжительность хранения после восстановления/размораживания, указание на возможность повторного замораживания (если применимо).

Рекомендуется пронумеровать реактивы в перечне для облегчения восприятия информации.

7. Подраздел «Стандартные образцы».

В случае использования международного стандартного образца указывается его наименование, аттестованная характеристика (концентрация, активность), производитель, актуальный каталожный номер.

В случае использования внутреннего стандарта фирмы указывается наименование, аттестованная характеристика, указание на то, относительно какого стандартного образца откалиброван (если применимо), условия хранения (температура, чувствительность к свету).

Если допускается альтернативное использование стандартных образцов, это необходимо отразить дополнительно.

8. Подраздел «Клеточные линии» (если применимо).

Указываются полные наименования всех используемых в испытании клеточных линий, наименования каталогов (коллекций), каталожные номера и условия хранения.

Если методика испытания описана для одной из нескольких допустимых к использованию клеточных линий, следует указать, что условия испытания могут быть изменены в зависимости от чувствительности используемой в конкретном случае клеточной линии.

Если клеточная линия является готовой к использованию в испытании (ready-to-use), это необходимо указать дополнительно.

Также следует уточнить, является ли культура клеток суспензионной или адгезионной, кратко описать морфологию жизнеспособных клеток.

9. Подраздел «Индикаторный вирус» (если применимо).

Указывается источник получения индикаторного вируса, информация о наличии в международных или отечественных коллекциях вирусов.

10. Подраздел «Животные» (если применимо).

Указываются вид, линия, пол, возраст, масса и количество животных, участвующих в испытании.

11. Подраздел «Приготовление питательных сред (если применимо), буферных растворов и растворов реактивов».

Последовательно приводятся названия всех используемых в испытании сред и растворов с указанием концентрации (если применимо) и процедуры их приготовления.

Целесообразно добавить примечание к подразделу, например с формулировкой «В соответствии с требованиями анализа может быть приготовлен иной объем растворов с сохранением пропорций компонентов».

Описание приготовления компонентов питательных сред следует приводить до описания приготовления сред с использованием этих компонентов, а не наоборот. Это должно соблюдаться и для растворов реактивов.

Если для буферного раствора требуется доведение pH, необходимо указать заданный диапазон значений pH и вещества, которые используются для доведения. Если доведение pH не предусмотрено, следует описать порядок действий в случае, когда pH приготовленного раствора не соответствует заданному диапазону, например, «Если pH приготовленного раствора не соответствует заданному, раствор готовят заново».

Особое внимание нужно уделить условиям приготовления сред и растворов (нагревание, перемешивание) с указанием продолжительности воздействия.

Важно указать продолжительность и условия хранения полученного раствора/среды. Если хранение раствора не предусмотрено, приводится уточнение: «Используют свежеприготовленным, после использования в испытании не хранят» или «Допускается хранение при температуре \_\_\_ °С до момента использования в испытании, но не более \_\_\_ часов».

Если перед использованием в испытании какие-либо растворы или среды должны быть нагреты или охлаждены до определенной температуры, это необходимо указать дополнительно.

При необходимости проведения предварительной квалификации каких-либо реагентов перед использованием в испытании приводится четкое описание проведения квалификации и критерии оценки полученных результатов.

12. Подраздел «Инициация клеточной культуры» (если применимо).

Отражает процедуру выведения клеток из замороженного состояния. В подразделе указываются требования по допустимому пределу жизнеспособности клеток при размораживании.

13. Подраздел «Рутинное культивирование» (если применимо).

Содержит следующую информацию:

- количество пассажей, которые должна пройти культура с момента инициации и до использования в испытании (пассажные уровни, на которых клетки наиболее пригодны для использования в испытании);

- номер пассажа, после которого культуру нельзя использовать в испытании;

- процедуру пересевов с указанием среды, используемой для рутинного культивирования, и концентрации ростового фактора (если применимо);

- концентрацию клеток для посева в зависимости от площади флакона и частоты пересевов;

- допустимый предел жизнеспособности клеток при посевах;

- процедуры подсчета клеток и определения плотности и жизнеспособности клеточной культуры;

- условия инкубации.

Если возможно, следует также привести пример морфологии жизнеспособных клеток (в виде фотографии).

14. Подраздел «Работа с индикаторным вирусом» (если применимо).

Содержит следующую информацию:

- процедуру приготовления клеточной линии для культивирования индикаторного вируса;

- условия и процедуру оттаивания, восстановления индикаторного вируса;

- процедуру культивирования индикаторного вируса (с указанием условий инкубации, необходимого количества пересевов);

- процедуру определения титра индикаторного вируса (приводятся схема расположения образцов на планшете с расшифровкой обозначений, формулы расчета титра и рабочей дозы, допустимый титр вируса для проведения испытания);

- процедуру создания рабочего банка вируса;

- процедуру замораживания и условия хранения.

15. Подраздел «Процедура проведения испытания».

Включает в себя подробное пошаговое описание методики с четким делением на этапы, начиная с пробоподготовки образцов, участвующих в испытании, и заканчивая учетом результатов испытания.

15.1. Если испытание проводится с использованием культуры клеток, то в начале подраздела целесообразно привести информацию о количестве независимых испытаний, достаточных для получения отчетного значения, и указать, что входит в понятие «независимое испытание», например, в следующей редакции: «Для получения отчетного значения требуется проведение *n* независимых испытаний. Одно независимое испытание — испытание, в котором одному планшету для анализа соответствует один планшет с разведениями; исходные разведения испытуемого, стандартного и контрольного образцов с концентрацией *c* нг/мл готовятся независимо для каждого планшета; в каждый планшет для анализа каждое из независимых разведений образцов (испытуемого, стандартного и/или контрольного) вносится в *u* повторностях. В ходе каждого независимого испытания может быть проанализировано не более *x* серий испытуемых образцов».

В пункте «Приготовление разведений испытуемого/стандартного/контрольного образцов» для каждого из образцов следует описать процедуру восстановления / размораживания / доведения до комнатной температуры в зависимости от исходного агрегатного состояния. Также следует указать условия и продолжительность хранения после восстановления/ размораживания, привести указание на возможность повторного замораживания (если применимо).

Для препаратов в форме мазей, гелей, свечей дополнительно описывают процедуру экстракции действующего вещества.

Процедура приготовления разведений испытуемого/стандартного/контрольного образцов описывается подробно и последовательно с указанием наименования растворителя, кратности серийных разведений, исходной концентрации образца и концентраций на всех этапах разведения, а также конечного объема каждого разведения. Наглядно последовательность разведений можно оформить в виде таблицы. Следует указать, какие из разведений будут участвовать в испытании и вноситься в планшет для анализа. Если разведения готовятся в планшете для разведений, приводится схема планшета для разведений с расшифровкой использованных сокращений.

В пункте «Подготовка клеток к использованию в испытании» приводится порядок подготовки клеток к внесению в планшет для анализа (в том числе количество процедур отмывания клеток от ростового фактора или от среды для культивирования). Указываются концентрация клеток в суспензии для внесения в планшет, допустимый предел жизнеспособности клеток, используемых в испытании, объем клеточной суспензии, лунки, в которые вносится клеточная суспензия, а также продолжительность и условия инкубации планшета до момента внесения образцов.

Далее в пункте «Внесение образцов и реагентов в планшет для анализа» указываются наименования, концентрации и объемы образцов и реагентов, а также порядок их внесения в лунки планшета. Приводится схема расположения образцов на планшете с расшифровкой обозначений. Уточняются продолжительность и условия инкубации планшета после внесения образцов и реагентов (если применимо).

Если испытание проводится с участием индикаторного вируса, дополнительно приводятся условия его подготовки

к проведению испытания, схема внесения в планшет в лунки с испытуемыми образцами, а также процедура контроля дозы индикаторного вируса с указанием критериев приемлемости.

15.2. Если испытание проводится на животных, то в начале подраздела приводится информация о количестве групп, участвующих в испытании, описываются порядок группировки животных по клеткам (по количеству/массе/полу), а также схема маркировки животных.

Далее в пункте «Приготовление разведений испытуемого/стандартного/контрольного образцов» приводится та же информация, что и в случае проведения испытания на культуре клеток (см. п. 15.1).

В пункте «Введение образцов животным» указываются концентрации и объемы образцов, вводимых животным, место введения, порядок группировки животных после введения образцов (если применимо), а также продолжительность и условия наблюдения.

В пункте «Забор образцов крови у животных» описывается процедура забора крови (место забора, объем образца) и последующие манипуляции с полученными образцами (обработка антикоагулянтном, окрашивание).

Пункт «Учет результатов» является общим независимо от биологической модели, на которой проводится испытание.

Учет результатов в подавляющем большинстве случаев осуществляется с помощью специальных приборов. Если параметры настроек прибора не являются стандартными, они должны быть описаны в тексте методики. Указываются длины волн, кратность увеличения (при визуальном учете с помощью микроскопа) и другие параметры считывания.

#### 16. Подраздел «Расчеты».

Содержит описание и формулы расчетов с подформульными расшифровками всех указанных в формуле величин. Размерность получаемой в результате расчетов величины должна совпадать с размерностью, указанной в спецификации и в подразделе «Норма».

Если для обработки результатов испытания предусмотрено использование статистической программы, указывается статистическая модель и ее параметры, которые должны быть заданы для получения отчетного значения.

Следует также привести пример стандартной кривой «доза–ответ» (если применимо).

#### 17. Подраздел «Критерии пригодности системы».

Содержит перечень критериев, касающихся результатов, полученных для стандартного (контрольного) образца.

18. Подраздел «Критерии приемлемости результатов испытания».

Содержит перечень критериев, касающихся результатов, полученных для испытуемого образца.

#### 19. Подраздел «Отчетное значение».

В подразделе указывают, что отчетное значение биологической (специфической) активности испытуемого образца рассчитывается по усредненным значениям  $n$  независимых испытаний, которые удовлетворяют всем нормам тестов пригодности системы и приемлемости результатов.

Также приводится указание о возможности проведения повторного испытания при несоответствии полученных результатов требованиям проекта НД по какому-либо критерию приемлемости результатов.

### Заключение

Для оценки специфической активности биотехнологических лекарственных препаратов используются в основном оригинальные методики, каждая из которых имеет свои осо-

бенности. При этом все методики являются сложными, длительными, для их воспроизведения в каждом конкретном случае необходима соответствующая культура клеток, свой набор материалов, питательных сред и реагентов, для учета результатов — высокочувствительное оборудование.

Изложение методик в нормативной документации должно быть полным, подробным, последовательным, понятным и недвусмысленным. Правильное оформление нормативной документации обеспечивает выполнение лабораторной фармацевтической экспертизы на должном уровне, что будет способствовать снижению количества запросов на предоставление дополнительных документов и данных, проведению экспертизы качества в установленные сроки и, что самое главное, поступлению в медицинскую практику эффективных и безопасных лекарственных средств.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

**Acknowledgments.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00023-18-02 and was supported by the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590049-0).

**Информация об отсутствии конфликта интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

### Литература / References

1. Федеральный закон Российской Федерации от 22 декабря 2014 г. № 429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» (редакция от 03.07.2016). [Federal Law of the Russian Federation of December 22, 2014, No. 429-FZ «On Amendments to the Federal Law «On Circulation of Medicines» (edition of July 3, 2016) (In Russ.)]
2. Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (редакция от 04.06.2018). [Federal Law of the Russian Federation of April 12, 2010, No. 61-FZ «On Circulation of Medicines» (edition of June 4, 2018) (In Russ.)]
3. ICH Topic Q 6 B: Note For Guidance on Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products (CPMP/ICH/365/96).
4. Лысикова СЛ, Головинская ОВ, Зубков ДА, Мовсесянц АА. Обеспечение качества испытания при оценке специфической активности биотехнологических лекарственных средств. *Медицинская иммунология*. 2017;19(S):273–4. [Lysikova SL, Golovinskaya OV, Zubkov DA, Movsesyants AA. Ensuring the Quality of the assay in estimating of the specific activity of biotechnological products. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology*. 2017;19(S):273–4 (In Russ.)]
5. Устинникова ОБ, Рунова ОБ, Величко ЕВ. Рекомендации к составлению нормативной документации на иммунобиологические лекарственные препараты в части физико-химических показателей качества. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2015;(3):8–12. [Ustinnikova OB, Runova OB, Velichko EV. Recommendations for drafting regulatory documents on immunobiological medicines particularly the section on physicochemical quality characteristics. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2015;(3):8–12 (In Russ.)]

6. ICH Topic Q 2 (R1): Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (CPMP/ICH/381/95).
7. Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик». Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1, М.; 2015. [General monograph 1.1.0012.15 Validation of analytical procedures. The State Pharmacopoeia of Russian Federation 13th ed. V. 1. Moscow; 2015 (In Russ.)]
8. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 2. М.: Гриф и К; 2014. [Guidance on evaluation of medicines. V. 2. Moscow: Grif i K; 2014 (In Russ.)]

### Об авторах

**Головинская Ольга Вячеславовна**, канд. мед. наук, эксперт 1 категории лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6966-9859>

**Лысикова Светлана Леонидовна**, канд. мед. наук, ведущий эксперт лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-7864-8972>

**Лебедева Юлия Николаевна**, ведущий эксперт лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8933-6966>

**Алпатова Наталья Александровна**, канд. биол. наук, главный эксперт лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6807-508X>

**Мовсесянц Арташес Авакович**, д-р мед. наук, профессор, начальник Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

**Меркулов Вадим Анатольевич**, д-р мед. наук, профессор, заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Поступила 04.07.2018

Принята к публикации 09.08.2018

### Authors

**Olga V. Golovinskaya**, Candidate of Medical Sciences, 1st Professional Category Expert of the Laboratory of Immunology of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6966-9859>

**Svetlana L. Lysikova**, Candidate of Medical Sciences, Leading Expert of the Laboratory of Immunology of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-7864-8972>

**Yuliya N. Lebedeva**, Leading Expert of the Laboratory of Immunology of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8933-6966>

**Natalia A. Alpatova**, Candidate of Biological Sciences, Chief Expert of the Laboratory of Immunology of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6807-508X>

**Artashes A. Movsesyants**, Doctor of medical sciences, Professor, Head of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunological Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

**Vadim A. Merkulov**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Deputy Director-General for Evaluation of Medicinal Products of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Received 4 July 2018

Accepted 9 August 2018

## Методические подходы к валидации технологических процессов получения терапевтических рекомбинатных белков на основе концепции «Quality by Design»

Н. В. Стратонова<sup>1,\*</sup>, А. С. Лисов<sup>1</sup>, А. Н. Морозов<sup>2</sup>, Д. В. Тюпа<sup>2</sup>, Р. А. Хамитов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ»,

ул. Тестовская, д. 10, офис 214, Москва, 123317, Российская Федерация

<sup>2</sup> Общество с ограниченной ответственностью «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ»,

ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

Валидация технологических процессов на основе концепции «качество, встроенное при разработке» (Quality by Design, QbD) требует глубокого научного понимания процессов и повышения их устойчивости путем внедрения новых технологий. Цель данной работы заключалась в обосновании методологического подхода на основе концепции QbD к валидации промышленного производства активной фармацевтической субстанции (АФС) дорназы альфа. Для этого было определено технологическое пространство процесса в демасштабированной модели — реакторах объемом 2 л; доказана репрезентативность данной модели по независимым от масштаба реактора параметрам; установлено сходство гидродинамических условий, конструктивных особенностей и режимов работы реакторов лабораторных, опытно-промышленных и промышленного объемов; показана масштабируемость процесса посредством демонстрации многовариантной математической модели PCA (Principal Component Analysis), перекрывающей объемы 2–1000 л, включающей входные, выходные параметры процесса и параметры качества продукта для ряда продуцентов рекомбинатных терапевтических белков, созданных на основе той же клеточной линии CHO и экспрессионной конструкции, что и продуцент дорназы альфа. Обоснована применимость инженерного пространства, которое определяется сочетанием конструктивных особенностей биореакторов и технологических параметров процесса, к различным масштабам путем проведения трех процессов в опытно-промышленном масштабе 100 л и двух процессов в промышленном масштабе 1000 л и построении на основе полученных данных модели PCA.

**Ключевые слова:** валидация; дорназа альфа; технологическое пространство; Quality by Design; инженерное пространство

**Для цитирования:** Стратонова НВ, Лисов АС, Морозов АН, Тюпа ДВ, Хамитов РА. Методические подходы к валидации технологических процессов получения терапевтических рекомбинатных белков на основе концепции «Quality by Design». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2018;18(3):175–183. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-175-183>

**Контактное лицо:** Стратонова Наталия Валерьевна; stratonova@ibcgenerium.ru

## Methodological Approaches to Validation of Therapeutic Recombinant Proteins Production Based on the Quality by Design Concept

N. V. Stratonova<sup>1,\*</sup>, A. S. Lisov<sup>1</sup>, A. N. Morozov<sup>2</sup>, D. V. Tyupa<sup>2</sup>, R. A. Khamitov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Joint-Stock company «GENERIUM»,

office 214, 10 Testovskaya St., Moscow 123317, Russian Federation

<sup>2</sup> Limited Liability Company «International Biotechnology Center «GENERIUM»,

14 Vladimirskaya St., Volginsky town, Petushinsky District, Vladimir Region 601125, Russian Federation

Validation of production processes based on the Quality by Design (QbD) principles calls for thorough scientific understanding of the processes and enhancement of their stability by implementation of new technologies. The aim of the study consisted in substantiating a QbD-based technological approach to validation of commercial production of dornase alfa. For this purpose a design space was established in a scale-down model, i.e. 2 L reactors; the model was shown to be representative in terms of all parameters except for the reactor size; the similarity of hydrodynamic conditions, design characteristics and operation modes of laboratory, pilot and commercial scale reactors was established; the process scalability was demonstrated by using the PCA (Principal Component Analysis) multivariate mathematical model including the volume range of 2–1000 L, input and output process parameters and product quality attributes for a number of recombinant therapeutic products derived from the same CHO cell line and expression construction as dornase alfa producer. The article demonstrates the applicability of engineering space, which includes bioreactor design features and production process parameters, to different production scales by implementing 3 processes at the pilot scale (100 L) and 2 processes at the commercial scale (1000 L) and building a PCA model based on the obtained data.

**Key words:** validation; dornase alfa; design space; Quality by Design; engineering space

**For citation:** Stratonova NV, Lisov AS, Morozov AN, Tyupa DV, Khamitov RA. Methodological approaches to validation of therapeutic recombinant proteins production based on the Quality by Design concept. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2018;18(3):175–183. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-175-183>

**Corresponding author:** Nataliya V. Stratonova; stratonova@ibcgenerium.ru

В настоящее время в разработке биологических лекарственных средств (ЛС) все чаще используется подход «качество, встроенное при разработке» (Quality by Design, QbD), основанный на использовании научных знаний, результатов исследований и оценки рисков для выявления и понимания характеристик сырья и параметров процесса, влияющих на критические показатели качества продукта. Данный подход изложен в руководствах ЕвРАЭС [1], ICH [2–5] и документе Product Development and Realisation Case Study A-Mab [6], составленном ведущими фармацевтическими компаниями.

Валидация технологического процесса в рамках подхода QbD, в отличие от традиционной валидации, основанной на проведении трех последовательных процессов производственного масштаба, включает совокупность данных и информации, полученных на всех этапах жизненного цикла продукта — от раннего этапа разработки до промышленного производства. Непрерывная верификация процесса обеспечивает его глубокое научное понимание и уверенность, что процесс будет гарантированно обеспечивать получение продукта с надлежащими параметрами качества.

Вместе с тем в нашей стране данный подход еще мало используется для снижения производственных и регуляторных рисков.

Цель работы — обоснование методологического подхода к валидации процесса промышленного получения активной фармацевтической субстанции (АФС) дорназы альфа на основе концепции QbD к разработке лекарственных средств и непрерывной валидации в ходе жизненного цикла продукта.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1) определить технологическое пространство (Design Space) процесса культивирования продуцента дорназы альфа на основании данных, полученных при разработке и характеристике процесса в демасштабированной модели — реакторах объемом 2 л, включающее в себя независимые от масштаба параметры и показывающее корреляцию между параметрами процесса и качеством целевого продукта (модель 1);

2) обосновать, что демасштабированная модель процесса культивирования продуцента дорназы альфа в объеме 2 л является репрезентативной и на основании полученных в ней данных возможно прогнозирование крупномасштабных производственных процессов, и, соответственно, технологическое пространство, разработанное для процесса культивирования продуцента дорназы альфа в биореакторах объемом 2 л, применимо к процессам в других объемах:

- показать сходство гидродинамических условий, конструктивных особенностей и режимов работы реакторов лабораторных, опытно-промышленных и промышленного объемов;

- показать масштабируемость процесса культивирования посредством демонстрации многовариантной математической модели PCA, перекрывающей объемы 2–1000 л, для ряда продуцентов рекомбинантных терапевтических белков, созданных на основе той же клеточной линии и экспрессионной конструкции, что и продуцент дорназы альфа;

3) продемонстрировать применимость разработанного технологического пространства к различным масштабам и обосновать инженерное пространство (Engineering Design Space) процесса культивирования дорназы альфа, которое определяется сочетанием конструктивных особенностей биореакторов и технологических параметров процесса, путем проведения трех процессов в опытно-промышленном масштабе 100 л и двух процессов в промышленном масштабе 1000 л и построения на основе полученных данных модели PCA (Principal Component Analysis) (модель 2);

4) создать многовариантную модель PLS процесса получения дорназы альфа для проведения непрерывной верификации процесса в ходе промышленного производства и доказательства того, что процесс является контролируемым.

### Материалы и методы

Продуцент рекомбинантной дорназы альфа (дезоксирибонуклеазы I) получен при стабильной трансфекции суспензионной клеточной линии CHO-M экспрессионной ДНК-конструкцией. В процессе культивирования целевой белок дорназа альфа экспрессировался в культуральную жидкость, а затем белок подвергали хроматографической очистке.

При разработке и характеристике процесса культивирования продуцента дорназы альфа использовали лабораторные реакторы объемом 2 л (Biostat B (Sartorius Stedim Biotech, Германия)). Для процессов опытно-промышленного масштаба использовали пилотные реакторы объемом 100 л (HyClone SUB 100, Thermo Fisher Scientific, США). Для коммерческого производства процесс масштабировали до промышленного объема 1000 л (HyClone SUB 1000, Thermo Fisher Scientific, США).

Для получения посевного материала культуру продуцента, хранящуюся в парах жидкого азота, расконсервировали и культивировали в жидкой питательной среде в колбах Эрленмейера и далее в волновых реакторах с рабочим объемом 5–20 л, перевеивая культуру каждые 72 ч.

Посевной материал переносили в производственный реактор и проводили процесс культивирования для получения целевого белка. Продуцент дорназы альфа культивировали на питательной среде SFM4CHO (HyClone, GE Healthcare, США) с добавлением питательных добавок Balan CD CHO Feed 3 (Irvine Scientific) и Balan CD CHO Feed 2 (Irvine Scientific). Заданное значение pH в процессе культивирования поддерживали подачей раствора гидроксида натрия и углекислого газа.

В ходе процесса контролировали содержание растворенного кислорода (датчик Hamilton, США), растворенного углекислого газа (датчик Mettler Toledo 4100), показатели pH (датчик Mettler Toledo), температуры, концентрацию глюкозы (анализатор Biosen C-line), а также вели мониторинг концентрации лактата (анализатор Biosen C-line), концентрации клеток и жизнеспособности культуры (метод подсчета в камере Горяева при окрашивании трипановым синим).

По окончании процесса культивирования определяли активность целевого белка в культуральной жидкости методом колориметрии. Полученную культуральную жидкость осветляли методом глубинной фильтрации и подвергали пятистадийной хроматографической очистке, после чего получали АФС дорназы альфа, которую анализировали, определяя содержание дезамидированной формы целевого белка методом ВЭЖХ; мономера, фрагментов и агрегатов методом гелевой фильтрационной ВЭЖХ; специфическую активность целевого белка методом колориметрии; содержание остаточных белков продуцента методом ИФА; содержание остаточной ДНК продуцента методом ПЦР.

Для построения математических моделей PCA и PLS (Partial Least Squares model) использовали программное обеспечение SIMCA (UMETRICS, Швеция).

Объемный коэффициент массопередачи кислорода  $k_L$  определяли динамическим методом, предварительно удаляя из тестовой среды растворенный кислород путем барботирования через нее азота, а затем измеряя скорость насыщения среды кислородом при подаче кислорода или воздуха в биореактор через микробарботер. Скорость удаления  $CO_2$  также определяли динамическим методом, предварительно насыщая

перед началом каждого эксперимента тестовую среду смесью воздуха/азота с 30 % CO<sub>2</sub> до равновесного состояния, а затем удаляя растворенный CO<sub>2</sub> путем барботирования воздухом/кислородом через микро- или макробарботер или подачей воздуха через головное пространство реактора над поверхностью жидкости. Матрица экспериментов была составлена в программе MODDE (UMETRICS, Швеция).

## Результаты и обсуждение

### Технологическое пространство процесса производства дорназы альфа

Данные, полученные при разработке и характеризации процесса культивирования продуцента дорназы альфа в демасштабированной модели в лабораторных реакторах объемом 2 л, использовали для анализа корреляции между рабочими параметрами процесса, независимыми от объема культивирования (температура, pH, концентрации растворенных кислорода, углекислого газа, глюкозы), выходными параметрами процесса (максимальная концентрация клеток, конечная жизнеспособность культуры, конечное содержание биомассы, максимальная концентрация лактата, активность целевого белка в культуральной жидкости, продолжительность процесса) и качеством продукта (содержание дезамидированной формы целевого белка, агрегатов, специфическая активность, содержание остаточных белков и ДНК продуцента).

Корреляция между параметрами процесса и качеством продукта проанализирована, в том числе путем построения математической модели с использованием метода частных наименьших квадратов (PLS). В модель PLS (модель 1) были включены 17 переменных, указанных выше, которые были выбраны, исходя из их значимости для продуктивности процесса и качества продукта.

Анализ модели PLS показывает, что пять основных компонентов объясняют 94,8 % варируемости данных; таким образом, фиксируются все существенные тенденции и корреляции в наборе данных ( $R^2X = 0,948$ ). Перекрестная проверка модели показала, что она прогнозирует 92,6 % вариаций будущих наблюдений ( $Q^2(\text{cum}) = 0,926$ ).

На рисунке 1 в качестве примера представлена диаграмма, полученная с помощью модели PLS, показывающая корреляцию между максимальной концентрацией жизнеспособных клеток, максимальной концентрацией лактата и конечной активностью целевого белка в культуральной жидкости.

Определение технологического пространства процесса получения дорназы альфа позволило установить границы рабочих параметров процесса, в рамках которых гарантируется получение продукта надлежащего качества.

### Применимость технологического пространства, разработанного в демасштабированной модели, к различным масштабам

Одним из главных условий для успешного масштабирования процесса культивирования является обеспечение равенства условий в различных объемах: в пилотном и промышленном объеме клетки должны находиться в той же микросреде и испытывать те же воздействия, что и в лабораторном масштабе при разработке процесса. От объема культивирования зависит гидродинамическая составляющая процесса и, соответственно, время смешения, гидродинамическое напряжение, оказываемое на клетки, массоперенос газов и субстрата. Кроме того, вследствие изменения гидродинамической составляющей процесса возможно появление градиентов pH, температуры, концентрации субстрата, концентраций растворенных кислорода и углекислого газа в культуральной среде.

Анализ взаимосвязи между конструкционными характеристиками биореактора, рабочими параметрами процесса куль-

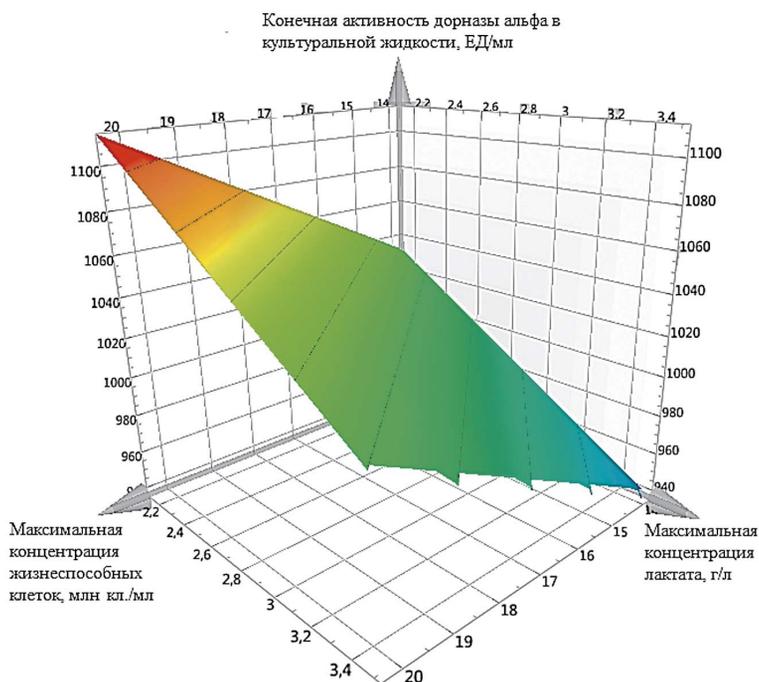


Рис. 1. Корреляция между максимальной концентрацией жизнеспособных клеток, максимальной концентрацией лактата и конечной активностью дорназы альфа в культуральной жидкости при анализе модели PCA (модель 1) по первому основному компоненту модели  $t[1]$ .

Fig. 1. Correlation between the maximum concentration of viable cells, maximum lactate concentration and the dornase alpha final activity in the culture fluid, observed when analysing the PCA model (model 1) for the first major component of the  $t[1]$  model.

тивирования, возможностями контроля процесса в различных биореакторах, качеством продукта и производительностью процесса обеспечивает основу для научного понимания влияния масштаба на процесс культивирования и продукт и определяет инженерное пространство процесса культивирования продуцента дорназы альфа.

Для масштабирования процессов культивирования от объема 2 л до 100 и 1000 л использованы параметры, характеризующие гидродинамические условия и массоперенос, приведенные в таблице 1.

**Анализ конструкции биореакторов лабораторного, пилотного и производственного масштаба**

Биореакторы, использованные в лабораторном, пилотном и промышленном процессах культивирования продуцента дорназы альфа, показаны на рисунке 2. Основные конструктивные и инженерные характеристики биореакторов приведены в таблице 2.

Как видно из приведенных данных, биореакторы обладают высокой степенью геометрического подобия; имеют аналогичную конструкцию мешалки; конструкцию и расположение портов для внесения добавок, датчиков и барботеров; аналогичные возможности управления процессом.

Поскольку способ подачи газов является наиважнейшим аспектом процесса культивирования, в том числе вследствие стрессового воздействия на клетки микропузырьков, образующихся при подаче газов через микробарботер, в лабораторном, пилотном и промышленном биореакторах были использованы микробарботер и макробарботер для создания аналогичных условий во всех объемах.

**Обоснование масштабируемости процесса культивирования продуцента дорназы альфа в объеме 2–1000 л посредством демонстрации многовариантной математической модели РСА для продуцента, созданного на основе аналогичной клеточной линии, экспрессионной конструкции и сходного процесса культивирования, что и продуцент дорназы альфа**

Чтобы продемонстрировать применимость демасштабированной модели процесса культивирования в объеме 2 л для прогнозирования процесса в биореакторе объемом 1000 л, построена математическая модель РСА с использованием метода главных компонентов РСА. Она включает входные, выходные параметры процесса и параметры качества продукта для про-

**Таблица 1.** Параметры, характеризующие гидродинамические условия и массоперенос, используемые при масштабировании процесса культивирования продуцента дорназы альфа  
**Table 1.** Parameters characterising hydrodynamic conditions and mass transfer, used for scaling up the process of cultivation of dornase alfa producer

Параметр масштабирования	Уравнение
Геометрическое подобие и конструкция реакторов	-
Входящая удельная мощность мешалки, $P/V$	$\frac{P}{V} = \frac{N_p \rho d_i^5 N^3}{V}$
Окружная скорость мешалки ( $V_{tip}$ )	$V_{tip} = \pi N D$
Время смешения ( $\Theta_m$ )	$\Theta_m = \left(\frac{3,24}{N}\right) \left(\frac{d_v}{d_i}\right)^{2,2}$
Объемный коэффициент массопередачи кислорода $k_L a_{O_2}$	$k_L a \propto \left(\frac{P}{V}\right)^\alpha \left(\frac{Q_G}{S}\right)^\beta$
Объемный коэффициент массопередачи углекислого газа $k_L a_{CO_2}$	$k_L a \propto \left(\frac{P}{V}\right)^\alpha \left(\frac{Q_G}{S}\right)^\beta$

дучента рекомбинантного терапевтического белка, созданного на основе аналогичной клеточной линии, экспрессионной конструкции и сходного процесса культивирования, что и продуцент дорназы альфа.

Модель приведена на рисунке 3. Модель построена на основе данных для 15 процессов культивирования продуцента рекомбинантного терапевтического белка в объеме 1000 л. В модель РСА включены 12 переменных: максимальная концентрация клеток, конечная жизнеспособность культуры, конечная концентрация клеток, pH, концентрации глюкозы и лактата, максимальная концентрация лактата, концентрация целевого белка, конечное содержание биомассы и параметры качества продукта (гликозилирование (содержание маннозосодержащих и галактозосодержащих гликанов) и содержание заряженных форм).

Анализ модели РСА показывает, что первые пять основных компонентов объясняют 98,2 % изменчивости данных ( $R^2 X = 0,982$ ); модель прогнозирует 95,9 % вариаций будущих наблюдений ( $Q^2(\text{sim}) = 0,959$ ). На основе данных для произ-



**Рис. 2.** Биореакторы, применяемые для культивирования продуцента дорназы альфа: А — Biostat B (Sartorius) объемом 2 л; Б — Hyclone SUB100 объемом 100 л; В — Hyclone SUB1000 объемом 1000 л.  
**Fig. 2.** Bioreactors used for cultivation of dornase alfa producer: А — 2 L Biostat B (Sartorius); Б — 100 L Hyclone SUB100; В — 1000 L Hyclone SUB1000.

Таблица 2. Основные конструкционные и инженерные характеристики биореакторов  
 Table 2. Main design features and engineering characteristics of bioreactors

Параметр, размерность	Биореактор		
	Biostat B*	SUB100**	SUB1000***
Конструкционные характеристики биореакторов			
Общий объем, л	3	120	1320
Максимальный рабочий объем, л	2	100	1000
Минимальный рабочий объем, л	1,5	50	500
Диаметр емкости биореактора (D), мм	130	438	959
Высота емкости биореактора (H), мм	240	953	2007
Соотношение H/D, мм	1,8	2,2	1,9
Высота жидкости (hL), мм	180	660	1422
Соотношение hL/D	1,4	1,5	1,5
Число уровней мешалок	1	1	1
Диаметр мешалки (dl), мм	54	146	321
Соотношение dl/D	0,41	0,33	0,33
Отбойники	Отсутствуют		
Скорость перемешивания, об/мин	100–400	50–145	65–85
Удельный расход газа, vvm	Макробарботер (воздух)		
	0,02–0,03	0,005–0,02	0,003–0,015
	Микробарботер (воздух)		
	до 0,05	0,008–0,009	0,008–0,009
	Микробарботер (кислород)		
	до 0,003	0,0005–0,005	0,0005–0,004
Конструкция барботеров и их расположение	Микробарботер с диаметром пор 20 мкм и кольцевой макробарботер с диаметром пор 1 мм	Микробарботер с диаметром пор 20 мкм и макробарботер (трубка) диаметром 2 см	
Подача газов	Доставка кислорода путем аэрации воздухом и кислородом через микробарботер. Удаление CO <sub>2</sub> подачей воздуха через макробарботер		
Расположение портов для внесения добавок	В крышке биореактора	В нижней части реактора в зоне работы мешалки и в крышке реактора	
Способ внесения подпитки	Калибруемый внешний насос		
Расположение датчиков	В нижней части реактора в зоне работы мешалки		
Контроль содержания растворенного кислорода DO, pH, температуры	Да		
Инженерные характеристики биореакторов			
Входная мощность мешалки P/V, Вт/м <sup>3</sup>	40	20	20
Объемный коэффициент массопередачи кислорода (аэрация воздухом) k <sub>L</sub> a O <sub>2</sub> , ч <sup>-1</sup>	12–20	11–12	10–11
Объемный коэффициент массопередачи кислорода (аэрация кислородом) k <sub>L</sub> a O <sub>2</sub> , ч <sup>-1</sup>	До 50	До 50	–
Объемный коэффициент массопередачи углекислого газа k <sub>L</sub> a CO <sub>2</sub> , ч <sup>-1</sup>	–	0,85–1,50	0,70–1,35
Окружная скорость мешалки, м <sup>-1</sup>	0,4–1,10	0,34–1,11	0,75–1,42
Время смешения, с	5–10	15–50	26–50

\* Лабораторный биореактор Biostat B (Sartorius) объемом 2 л.

\*\* Пилотный биореактор Nucleon SUB100 объемом 100 л.

\*\*\* Промышленный биореактор Nucleon SUB1000 объемом 1000 л.

водственного объема 1000 л построен 95 % доверительный эллипсоид для пяти основных компонентов, а затем данные для 12 процессов культивирования продуцента рекомбинантного терапевтического белка в объеме 2 л использовали для прогнозирования пространственных координат этих процессов в многомерном пространстве, образованном процессами в производственном объеме 1000 л. Как показано на рисунке 3, процессы в объеме 2 л находятся в пределах многомерного 95 % доверительного эллипсоида процессов в объеме 1000 л, что указывает на то, что обе совокупности данных имеют сопоставимые тенденции и обладают аналогичными структурами корреляции.

Результат анализа математической модели PCA показывает достоверность применимости реактора объемом 2 л в качестве демасштабированной модели производственных биореакторов объемом 1000 л.

**Демонстрация применимости разработанного технологического пространства к различным масштабам и обоснование инженерного пространства (Engineering Design Space) процесса культивирования продуцента дорназы альфа**

Для оценки сопоставимости входных и выходных параметров процесса и качества продукта на основании данных по 17 переменным, полученным в процессах в объеме 2, 100 и 1000 л, построена математическая модель PCA (модель 2), которая является обоснованием инженерного пространства (Engineering Design Space) процесса культивирования продуцента дорназы альфа.

На данный момент модель PCA разработана с использованием данных о процессе и качестве продукта, полученных в ходе характеристики процесса (объем реактора 2 л, 20 процессов), а

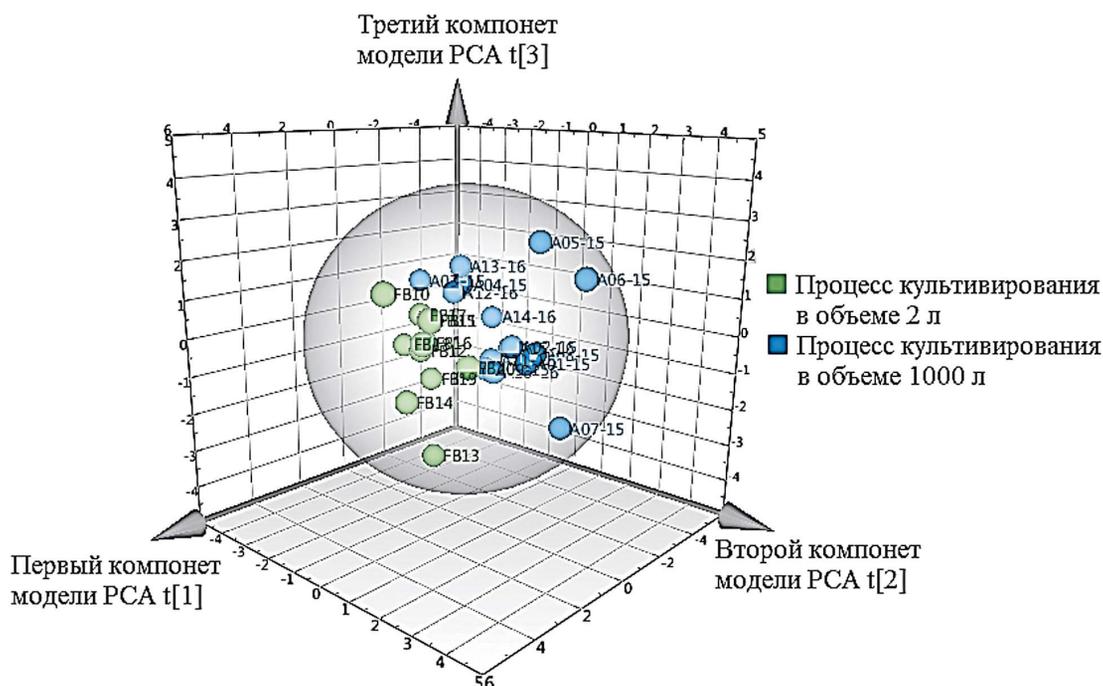
также трех процессов в 100 л, двух процессов в 1000 л, приведенных в таблице 3. После получения достаточного количества данных для производственного объема 1000 л модель PCA будет переработана для использования в непрерывном мониторинге процесса в промышленном производстве.

Результаты модели PCA показывают, что 6 основных компонентов объясняют 95,1 % изменчивости набора данных ( $R^2X = 0,951$ ). Перекрестная проверка модели показала, что она предсказывает 93,9 % вариаций будущих наблюдений ( $Q^2(\text{sim}) = 0,939$ ). Как показано на рисунке 4, процессы в объеме 100 и 1000 л находятся в пределах многомерного 95 % доверительного эллипсоида, построенного на основе данных о процессе и качестве продукта, полученных в объеме реактора 2 л.

**Непрерывная верификация процесса на основе модели PLS в промышленном производстве**

Данный подход к валидации технологического процесса отличается от традиционного подхода с проведением трех последовательных валидационных процессов промышленного объема. Фактически, данные по двум процессам в объеме 1000 л использовались для демонстрации валидности разработанного технологического пространства для процесса промышленного масштаба. В результате показано, что качество продукта и входные и выходные параметры процесса находятся в пределах установленных критериев приемлемости.

Поскольку два процесса в промышленном объеме не могут полностью охватить возможную изменчивость процесса, для того, чтобы гарантировать, что процесс промышленного производства находится в состоянии контроля на протяжении всего жизненного цикла, для непрерывной верификации процесса создана многомерная статистическая модель PLS.

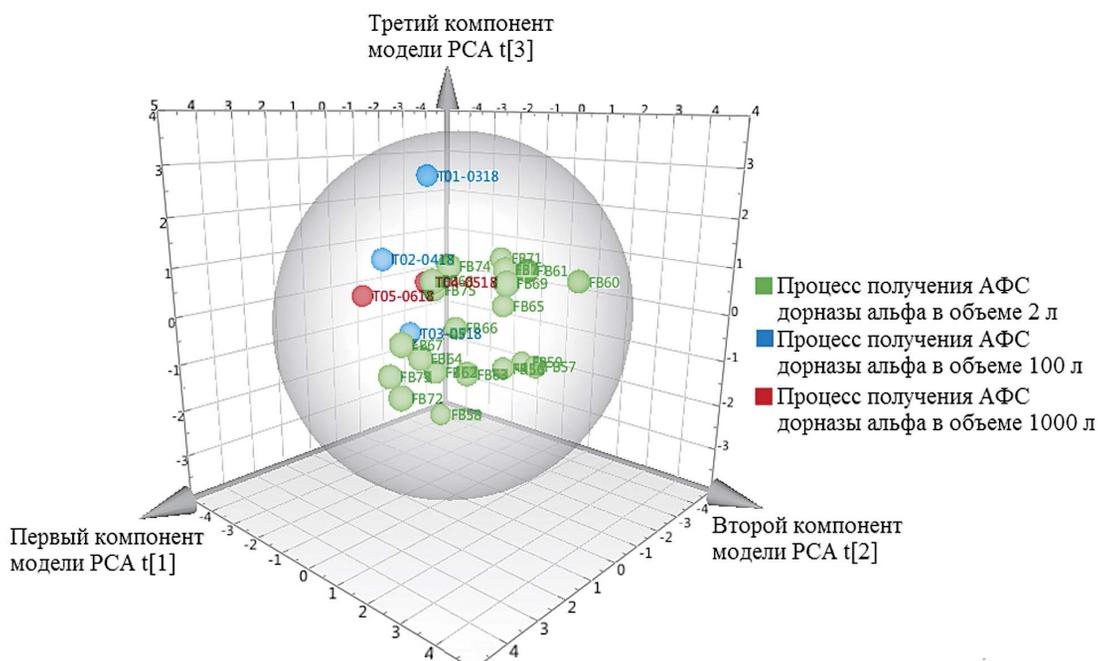


**Рис. 3.** Многомерный 95 % доверительный эллипсоид, построенный для процессов культивирования в объеме 1000 л, и прогнозируемые значения для процессов культивирования в объеме 2 л, определенные в модели PCA для продуцента рекомбинантного терапевтического белка, созданного на основе аналогичной клеточной линии, экспрессионной конструкции и сходного процесса культивирования, что и продуцент дорназы альфа.

**Fig. 3.** Multidimensional 95 % confidence ellipsoid built for cultivation processes in 1000 L reactors, and predicted values for cultivation in 2 L reactors that were established in the PCA model for the producer of the recombinant therapeutic protein derived from a similar cell line, expression construct and cultivation process as those used for the dornase alpha producer.

**Таблица 3.** Входные и выходные параметры процесса культивирования и параметры качества АФС дорназа альфа, полученные в лабораторном, опытно-промышленном и производственном масштабах  
**Table 3.** Input and output data of the cultivation process, and quality attributes of the dornase alfa API obtained at laboratory, pilot and commercial production scales

Параметр процесса, размерность	Наименование биореактора		
	Biostat B (Sartorius)	Hyclone SUB100	Hyclone SUB1000
<b>Входные параметры процесса</b>			
Объем, л	2	100	1000
pH	6,90 ± 0,1	6,90 ± 0,05	6,90 ± 0,05
Температура	37 °C в первые 5 суток процесса, далее — 32 °C		
Концентрация глюкозы	3,5–0,5 г/л с 7 до 15 суток процесса		
Содержание CO <sub>2</sub>	3–8 % в первые 5 суток процесса, далее — не более 35 %		
Содержание O <sub>2</sub> , %	25–35	25–35	25–35
<b>Выходные параметры процесса</b>			
Максимальная концентрация клеток, млн кл./мл	15,8–20,4	13,7–17,7	15,5
Конечная жизнеспособность культуры, %	84–93	85–94	94
Конечное содержание биомассы, мл/л	28–37	34–35	34–35
Максимальная концентрация лактата, г/л	2,1–2,98	2,7–3,5	2,7–3,5
Активность целевого белка в культуральной жидкости, ЕД/мл	900–1200	943–1088	900–1000
Продолжительность процесса, сут	12–14	14	14
<b>Параметры качества АФС дорназа альфа</b>			
Содержание дезамидированной формы целевого белка, %	43–60	43,8–62,3	44–44,5
Содержание агрегатов, %	0,02–0,8	0,02–0,4	0,4–0,5
Специфическая активность, ЕД/мл	1100–1250	1003–1137	1116–1220
Содержание остаточных белков продуцента, нг/мг rDnz-α	0,3–10	0,3	0,3
Содержание остаточной ДНК продуцента, пг/мг rDnz-α	2–10	2	2



**Рис. 4.** 95 % доверительный эллипсоид модели PCA, построенный с использованием данных процессов в объеме 2 л (20 процессов), 100 л (3 процесса), 1000 л (2 процесса).  
**Fig. 4.** PCA model 95 % confidence ellipsoid which was built using the data of production processes implemented using 2 L reactors (20 processes), 100 L reactors (3 processes), 1000 L reactors (2 processes).

Для непрерывного мониторинга производственного процесса использовались off-line (ежедневный контроль концентрации клеток, жизнеспособности, концентрации глюкозы, лактата и т.д.), а также on-line и in-line данные (рН, температура, концентрации растворенных кислорода и углекислого газа, расход газов, давление, вес реактора и т.д.). Модель PLS состоит из трех компонентов, которые совокупно объясняют 96,2 и 87,3 % вариации по данным X и Y соответственно ( $R^2(X) = 0,962$ ,  $R^2(Y) = 0,873$ ). Кроме того, модель имеет высокую прогностическую мощность ( $Q^2(\text{sim}) = 0,854$ ). Контрольная диаграмма траектории первого основного компонента статистической модели PLS  $t[1]$ , его допустимого диапазона и траектории двадцати процессов в объеме 2 л, трех процессов в 100 л, двух процессов в 1000 л приведена на рисунке 5.

Метод многомерного моделирования для периодических процессов отображает динамическую природу процесса, характеризует технологическое пространство, в котором протекает процесс, и определяет границы процесса. Мониторинг в режиме реального времени обеспечивает постоянный контроль производства и раннее обнаружение трендов процесса.

### Выводы

Для обоснования подхода к валидации процесса промышленного получения дорназы альфа, основанного на концепции QbD, решены следующие задачи:

1) определено технологическое пространство (Design Space) процесса культивирования продуцента дорназы альфа, включающее в себя независимые от масштаба параметры и показывающее корреляцию между параметрами процесса и качеством целевого продукта (модель 1);

2) обоснована демасштабированная модель процесса культивирования продуцента дорназы альфа в объеме 2 л;

3) показана применимость разработанного технологического пространства к различным масштабам; показана

сопоставимость АФС дорназы альфа, полученной в объеме 2, 100 и 1000 л (табл. 3), и таким образом подтверждено инженерное пространство процесса культивирования продуцента дорназы альфа (модель 2);

4) для проведения непрерывной верификации процесса в ходе промышленного производства и доказательства того, что процесс является контролируемым, создана многовариантная модель PLS процесса получения АФС дорназы альфа. Таким образом, два процесса в объеме 1000 л являются стартовой точкой непрерывной верификации процесса и подхода к валидации как к части жизненного цикла продукта, и требования GMP к квалификации процесса соблюдены.

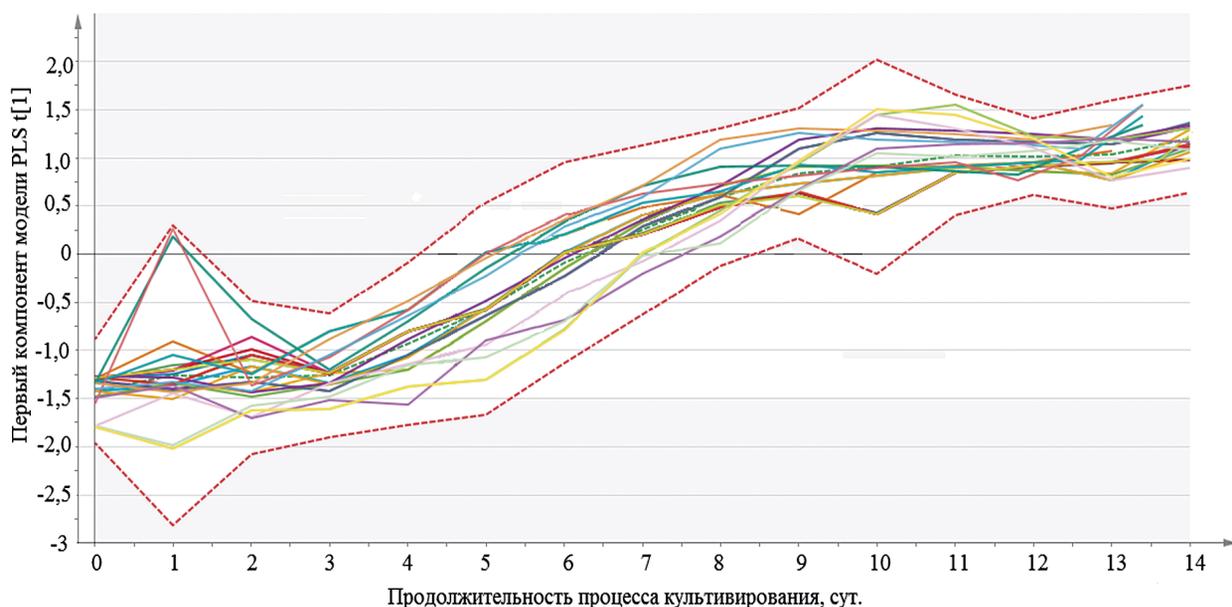
Подход к валидации технологического процесса на основе концепции QbD включает совокупность данных и информации, полученных на всех этапах жизненного цикла продукта, что обеспечивает глубокое понимание процесса и позволяет внедрить в рутинное производство непрерывную верификацию процесса и, соответственно, гарантировать получение продукта с надлежащими параметрами качества.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность за помощь в проведенной работе сотрудникам отдела аналитических методов ООО «МБЦ «ГЕНЕРИУМ» под руководством А.Ю. Вишневого. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

**Acknowledgments.** The authors are thankful for the help of specialists of the Analytical Methods Department at LLC IBC «GENERIUM» guided by Vishnevsky A.Y. This research received no specific grant from any funding agency.

**Информация об отсутствии конфликта интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.



**Рис. 5.** Контрольная диаграмма траектории первого основного компонента статистической модели PLS  $t[1]$  (---), его допустимого диапазона (среднее значение  $\pm 3$  ст. откл. (- - -)) и траектории двадцати процессов в объеме 2 л, трех процессов в 100 л, двух процессов в 1000 л.

**Fig. 5.** Control chart of the trajectory of the first major component of the PLS  $t[1]$  statistical model (---), its acceptable range (mean value  $\pm 3$  st. dev. (- - -)) and the trajectory of twenty production processes implemented using 2 L reactors, three processes using 100 L reactors, and two processes using 1000 L reactors.

## Литература / References

1. Руководство по валидации процесса производства лекарственных препаратов для медицинского применения. Приложение к Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26 сентября 2017 г. № 19. [Guidance on Validation Production Process of Medicinal Products for Medical Use. Annex to the Recommendation of the Eurasian Economic Commission Board of 26 September, 2017 No 19 (In Russ.)]. Available from: <http://docs.cntd.ru/document/456095627>
2. ICH Q11 Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities) Q11; 2012. Available from: [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q11/Q11\\_Step\\_4.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q11/Q11_Step_4.pdf)
3. ICH Q12 Technical and Regulatory Considerations for Pharmaceutical Product Lifecycle Management Q12; 2017. Available from: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q12/Q12\\_DraftGuideline\\_Step2\\_2017\\_1116.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q12/Q12_DraftGuideline_Step2_2017_1116.pdf)
4. ICH Q10 Pharmaceutical Quality System Q10; 2008. Available from: [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q10/Step4/Q10\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q10/Step4/Q10_Guideline.pdf)
5. ICH Q9 Quality Risk Management Q9; 2005. Available from: [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q9/Step4/Q9\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q9/Step4/Q9_Guideline.pdf)
6. A-Mab: a Case Study in Bioprocess Development. CMC Biotech Working Group. Version 2.1. Product Development and Realisation Case Study A-Mab; 2009. Available from: [https://cdn.ymaws.com/www.casss.org/resource/resmgr/imported/A-Mab\\_case\\_study\\_Version\\_2-1.pdf](https://cdn.ymaws.com/www.casss.org/resource/resmgr/imported/A-Mab_case_study_Version_2-1.pdf)

## Об авторах

**Стратонова Наталья Валерьевна**, канд. биол. наук, начальник Управления экспериментального производства АО «ГЕНЕРИУМ», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-9555-1950>

**Лисов Антон Сергеевич**, старший технолог Управления экспериментального производства АО «ГЕНЕРИУМ», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6716-9570>

**Морозов Антон Николаевич**, начальник отдела разработки процессов ООО «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6960-6148>

**Тюпа Дмитрий Валерьевич**, научный сотрудник отдела разработки процессов ООО «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2399-4434>

**Хамитов Равиль Авгатович**, д-р мед. наук, профессор, генеральный директор ООО «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-1314-894X>

Поступила 26.07.2018

Принята к публикации 09.08.2018

## Authors

**Nataliya V. Stratonova**, Candidate of Biological Sciences, Head of the Experimental Production Department of the Joint-Stock Company «GENERIUM», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-9555-1950>

**Anton S. Lisov**, Senior Technology Specialist of the Experimental Production Department of the Joint-Stock Company «GENERIUM», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6716-9570>

**Anton N. Morozov**, Head of the Department for Technological Process Development of the Limited Liability Company «International Biotechnology Center «GENERIUM», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6960-6148>

**Dmitry V. Tyupa**, Staff Scientist of the Department for Technological Process Development of the Limited Liability Company «International Biotechnology Center «GENERIUM», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2399-4434>

**Ravil A. Khamitov**, Doctor of Medical Science, Professor, General Director of the Limited Liability Company «International Biotechnology Center «GENERIUM», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-1314-894X>

Received 26 July 2018

Accepted 9 August 2018

## Подходы к фармацевтическому анализу современных пептидных и олигонуклеотидных препаратов на примере инновационного препарата на основе малой интерферирующей РНК для лечения бронхиальной астмы

Л. М. Красных<sup>1</sup>, В. В. Смирнов<sup>1,2,\*</sup>, Г. В. Раменская<sup>1</sup>, Г. Ф. Василенко<sup>1</sup>, И. П. Шиловский<sup>2</sup>, М. Р. Хаитов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Петровский бульвар, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России  
Каширское шоссе, д. 24, Москва, 115478, Российская Федерация

Используемые методы для контроля качества лекарственных средств пептидной природы зависят от уровня развития аналитической и биоорганической химии и развития приборной базы. Анализ подлинности пептида представляет собой непростую задачу и во многом зависит от сложности его структуры. Не существует однозначного и достаточно простого теста, за исключением ЯМР, который, однако, является дорогостоящим и длительным методом со сложной интерпретацией данных. Причем этот метод не позволяет однозначно установить чистоту и формулу пептида (аминокислотный состав, последовательность, хиральность аминокислотных остатков). По этой причине нередко используется комбинация методов, включая аминокислотный анализ, ТСХ/ВЭЖХ и масс-спектрометрию и, более редко, секвенирование. В мировой практике для исследования пептидов наиболее распространен метод ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрическим, преимущественно tandemным (ВЭЖХ-МС/МС) детектированием. Для установления аминокислотной последовательности линейных пептидов описано применение различных ферментов с последующей идентификацией продуктов протеолиза масс-спектрометрически. В данной статье представлены подходы к разработке методик определения подлинности и чистоты инновационного лекарственного препарата пептидной природы на основе малой интерферирующей РНК с целью стандартизации и контроля качества на производстве.

**Ключевые слова:** малая интерферирующая РНК (миРНК); бронхиальная астма; пептид; стандартизация; ТСХ; ВЭЖХ-МС/МС; MALDI-TOF

**Для цитирования:** Красных ЛМ, Смирнов ВВ, Раменская ГВ, Василенко ГФ, Шиловский ИП, Хаитов МР. Подходы к фармацевтическому анализу современных пептидных и олигонуклеотидных препаратов на примере инновационного препарата на основе малой интерферирующей РНК для лечения бронхиальной астмы. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2018;18(3):184–190. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-184-190>

\* Контактное лицо: Смирнов Валерий Валерьевич; [vall@mail.mipt.ru](mailto:vall@mail.mipt.ru)

## Approaches to Pharmaceutical Analysis of Modern Peptide and Oligonucleotide Products as Illustrated by a Small Interfering RNA-Based Novel Therapeutic for the Treatment of Bronchial Asthma

L. M. Krasnykh<sup>1</sup>, V. V. Smirnov<sup>1,2,\*</sup>, G. V. Ramenskaya<sup>1</sup>, G. F. Vasilenko<sup>1</sup>, I. P. Shilovsky<sup>2</sup>, M. R. Haitov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,  
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

<sup>2</sup> National Research Centre «Institute of Immunology» of the  
Federal Medical-Biological Agency of Russia  
24 Kashirskoe highway, Moscow 115478, Russian Federation

Methods used to control the quality of peptide products depend on the level of development of analytical and bioorganic chemistry, and the level of instrumentation. Peptide identification is a difficult task and largely depends on the complexity of its structure. There does not exist a comprehensive and simple test, except for NMR, which, however, is rather expensive and time-consuming and involves complex data interpretations. Moreover, it does not allow for unambiguous determination of the peptide purity and formula (amino acid composition, sequence, chirality of amino acid residues). For this reason, a combination of methods is often used, including amino acid analysis, TLC/HPLC and mass spectrometry, and, less frequently, sequencing. Current international practice of peptide analysis is to use HPLC in combination with mass spectrometric, mainly tandem (HPLC-MS/MS), detection. According to literature sources the amino acid sequence of linear peptides can be analysed using various enzymes and subsequent identification of proteolysis products by mass spectrometry. This article presents ap-

proaches to the development of test methods for analysis of purity and identification testing of a small interfering RNA-based novel medicinal product, which will help standardise and control the quality of the production process.

**Key words:** small interfering RNA (siRNA); bronchial asthma; peptide; standardisation; TLC; HPLC-MS/MS; MALDI-TOF

**For citation:** Krasnykh LM, Smirnov VV, Ramenskaya GV, Vasilenko GF, Shilovsky IP, Haitov MR. Approaches to pharmaceutical analysis of modern peptide and oligonucleotide products as illustrated by a small interfering RNA-based novel therapeutic for the treatment of bronchial asthma. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(3):184–190. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-184-190>

**Corresponding author:** Valery V. Smirnov; [vall@mail.mipt.ru](mailto:vall@mail.mipt.ru)

Одним из наиболее перспективных подходов для лечения аллергических заболеваний, в том числе бронхиальной астмы, считается РНК-интерференция. Под интерференцией РНК понимают естественный механизм регуляции экспрессии генов в клетке с участием фермента Dicer и молекул малых интерферирующих РНК (миРНК) [1]. Как было изначально установлено, этот механизм выполняет важную функцию в клетках растений и животных, а именно — защищает их от генетически чужеродных агентов, таких как вирусы и транспозоны [2]. Методы, основанные на использовании механизмов интерференции РНК, входят сегодня в число основных методов молекулярной биологии, используемых для регуляции активности генов. Суть феномена интерференции РНК заключается в подавлении экспрессии гена на стадии транскрипции или трансляции при активном участии молекул миРНК. Механизм интерференции РНК заключается в том, что при введении в клетку короткой двухцепочечной РНК (дцРНК) происходит специфическое разрушение гомологичной мРНК.

К настоящему времени показана принципиальная возможность использования технологии РНК-интерференции для подавления генов, участвующих в патогенезе аллергопатологий, как в экспериментах *in vitro* [3], так и *in vivo* [4].

Главными преимуществами использования препаратов на основе миРНК являются высокая специфичность подавления экспрессии генов, вовлеченных в патогенез, а также высокая эффективность их подавления (до 90 %), так как вводимые миРНК способны действовать в крайне низких концентрациях. Кроме того, привлекательной является сравнительная дешевизна методики. Синтез олигонуклеотидов в настоящее время вполне доступен и прост в масштабировании. Этот факт дает препаратам, созданным на базе миРНК, важное конкурентное преимущество, например, по сравнению с моноклональными антителами.

Открытие РНК-интерференции [5] как способа регуляции генной экспрессии дало мощный толчок для исследователей, а также фармацевтическим компаниям к разработке генотерапевтических препаратов на основе молекул миРНК. Подобные препараты проявляют свою биологическую активность после их проникновения в цитоплазму или ядро клетки. Однако самопроизвольно нуклеиновые кислоты не способны преодолевать цитоплазматические и ядерные барьеры. Поэтому главным препятствием для внедрения подобных препаратов в медицинскую практику является отсутствие эффективных и нетоксичных средств доставки генетических конструкций в клетки-мишени. Исследованиям по созданию систем доставки уделяется большое внимание [6].

В результате проведенных исследований был выбран комплекс вспомогательного вещества-носителя — катионного дендримерного пептида b-LTP в основной форме и фармацевтической субстанции — молекул миРНК (siL4-153 и siL13-395). Пептид b-LTP имеет характерную разветвленную, дендримерную структуру, поэтому он содержит не только природные,

α-амидные, но и ε-амидные связи (преимущественно). Такие связи не подвергаются протеолизу стандартными ферментами, применяемыми для ограниченной деградации пептида для установления его структуры. В этой связи для анализа b-LTP из доступных методов пригодны хроматографический и масс-спектрометрический [7].

Для определения качества молекул миРНК наиболее технологичным методом, подтверждающим не только структуру нуклеотидной последовательности, но также и отсутствие негидролизированных защитных групп, является метод масс-спектрометрии.

Традиционными методами контроля качества олигонуклеотидов можно назвать методы гель-электрофореза и ВЭЖХ, однако по точности данные методы уступают методу масс-спектрометрии MALDI-TOF. Точность определения массы синтезированного олигонуклеотида методом MALDI-TOF — не ниже 0,1 %. Данный метод позволяет определять практически все ошибки синтеза олигонуклеотида, который включает непосредственно синтез и снятие защитных групп.

Цель работы — разработка и валидация методик фармацевтического анализа препарата пептидной природы на основе миРНК для лечения бронхиальной астмы.

## Материалы и методы

**Лекарственное средство (ЛС)** представляет собой комплекс вспомогательного вещества (ВВ) — катионного дендримерного пептида b-LTP в основной форме и фармацевтической субстанции (ФС) — молекул миРНК (siL4-153 и siL13-395) в массовом соотношении 12,5/1. ФС содержит молекулы миРНК состава 5-AAAGAUGUCUGUUACGGUctt-3 (для siL4-153) и 5-UGCUCUUAUUAAGAAtt-3 (для siL13-395); вспомогательное вещество содержит катионный дендримерный пептид b-LTP в основной форме, отвечающий химическому строению (Arg)8 (Lys)4 (Lys)2 Lys-Ala-Cys-NH<sub>2</sub>.

**Вспомогательное вещество.** Для подтверждения структуры полученного пептида использовали метод масс-спектрометрии (масс-спектрометр Microflex LT (Bruker, Daltonics)), основанный на матрично-ассоциированной лазерной десорбции/ионизации анализируемого вещества с времяпролетным детектором. В данном методе ионизация аналита происходит через матрицу, которая поглощает энергию лазера и передает ее анализируемому веществу. В качестве матрицы применяли α-циано-4-гидроксициннамовую кислоту (HCCA), которая наиболее приемлема для MS-анализа пептидов и белков. **Приготовление матрицы и образца:** готовят раствор 1,4 мг/мл HCCA в системе ацетонитрил — вода — трифторуксусная (85:15:0,1), пептид растворяют в деионизированной воде. На планшет для MALDI наносят 0,5 мкл образца и 0,5 мкл раствора матрицы.

В качестве метода оценки чистоты использовали обращенно-фазовую хроматографию с УФ-детектированием с использованием прибора (жидкостной хроматограф Agilent 1200), оснащенного фотодиодноматричным детектором (Agilent Tech-

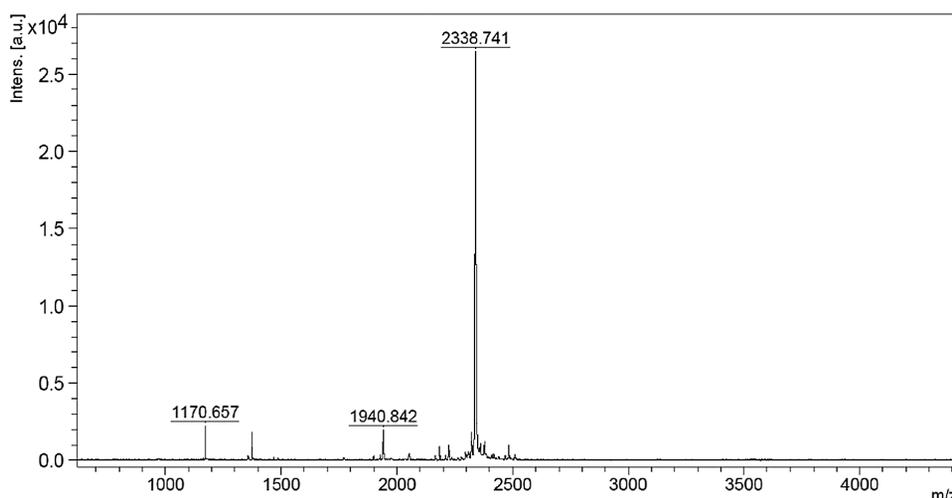


Рис. 1. Масс-спектр b-LTP, снятый в режиме MALDI-TOF.  
Fig. 1. MALDI-TOF mass spectrum of b-LTP.

pologies, США). Неподвижная фаза — С18 как наиболее подходящая для анализа катионного пептида b-LTP, исходя из его физико-химических свойств. Состав подвижной фазы — фосфатный буфер (рН 7,4) — ацетонитрил в соотношении 25:75. Скорость потока 1 мл/мин. Объем вводимой пробы 10 мкл. Колонка С18 150 × 4,6 мм; 5 мкм. Детектирование проводят при длине волны 220 нм. Время хроматографирования — 4 мин.

**Фармацевтическая субстанция.** Для подтверждения структуры полученной фармацевтической субстанции — молекул мРНК применили метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI) с использованием масс-спектрометра Bruker Microflex LT (матрица 3-НРА). **Приготовление матрицы и образца:** готовят раствор 3-гидрокси-пиколиновой кислоты 30 мг/мл с цитратом аммония 0,5 мг/мл. На планшет для MALDI наносят 0,5 мкл образца и 0,5 мкл раствора матрицы.

В качестве метода оценки чистоты ФС использовали обращенно-фазовую хроматографию с УФ-детектированием с использованием прибора — жидкостной хроматограф Agilent 1200, оснащенный фотодиодноматричным детектором (Agilent Technologies, США). Неподвижная фаза — С18 как наиболее подходящая для анализа катионного пептида b-LTP, исходя из его физико-химических свойств. Состав подвижной фазы — фосфатный буфер (рН 7,4) — ацетонитрил в соотношении 25:75. Скорость потока 1 мл/мин. Объем вводимой пробы 10 мкл. Колонка: С18 150 × 4,6 мм 5 мкм. Детектирование проводили при длине волны 220 нм. Время хроматографирования — 4 мин.

**Лекарственное средство.** Для одновременной оценки подлинности таких химически разнородных соединений оптимально подходит методика, основанная на ВЭЖХ-УФ. В данном случае подлинность оценивают по времени удерживания основных пиков, соответствующих ВВ и ФС. Для одновременной оценки чистоты ВВ и ФС оптимально подходит методика на основе ВЭЖХ-УФ, где чистота оценивается по площади основных пиков, соответствующих ВВ и ФС.

В качестве метода оценки чистоты и подлинности использовали обращенно-фазовую хроматографию с УФ-детектированием с использованием прибора — жидкостной хроматограф Agilent 1200, оснащенный фотодиодноматричным детектором, (Agilent Technologies, США). Неподвижная фаза — С18 как наиболее подходящая для анализа катионного пептида b-LTP, исходя из его физико-химических свойств. Состав подвижной фазы — фосфатный буфер (рН 7,4) — ацето-

нитрил в соотношении 25:75. Скорость потока 1 мл/мин. Объем вводимой пробы 10 мкл. Колонка: С18 150 × 4,6 мм, 5 мкм. Детектирование проводят при длине волны 220 нм. Время хроматографирования — 4 мин.

## Результаты и обсуждение

### Катионный пептид b-LTP

Данные масс-спектрометрии подтверждают структуру LTP как в солевой форме, так и в основной форме, b-LTP. Спектр MALDI (позитивная мода) для обоих вариантов свидетельствует о наличии мажорного пика при  $m/z$  2338 ( $\pm 1$  за счет протонирования), соответствующего молекулярной массе чистого пептида. Масс-спектр приведен на рисунке 1. В процессе разработки методики был проверен еще один тип ионизации — ионизация электроспреем при атмосферном давлении (Electrospray Ionization, ESI). Данный метод рассматривался одновременно как альтернативный MALDI-TOF и в то же время выступал контрольным, подтверждая результат. Контрольный спектр в режиме «электроспрей» (ESI) также подтверждает структуру LTP (рис. 2). В спектре присутствуют следующие пики ионов:  $m/z$  390,6 — шестизарядный ион пептида,  $m/z$  468,5 — пятизарядный ион пептида,  $m/z$  585,3 — четырехзарядный ион пептида,  $m/z$  780,3 — трехзарядный ион пептида. Из этого следует, что молекулярная масса пептида составляет 2338 Да, что соответствует расчетным данным. Однако в качестве аналитического метода был выбран метод ионизации MALDI-TOF как наиболее информативный.

В результате анализа чистоты методом ВЭЖХ-УФ на представленной хроматограмме четко виден пик, соответствующий катионному пептиду b-LTP. Значение процентного содержания пептида в навеске испытуемого пептида находилось в пределах от 95 до 105 %. Прочие пики или пики несимметричной формы отсутствовали. Типичная хроматограмма приведена на рисунке 3.

Была проведена валидация разработанной методики. Валидация выполнена в соответствии с нормами GCP/GLP, руководством FDA для предприятий «Bioanalytical method validation» (май 2001 г.), руководством EMEA «Guideline on bioanalytical method validation» (2011 г.), ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений», Государственной фармакопеей РФ XIII издания (ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик»), а также стандартными операционными процедурами (СОП) иссле-

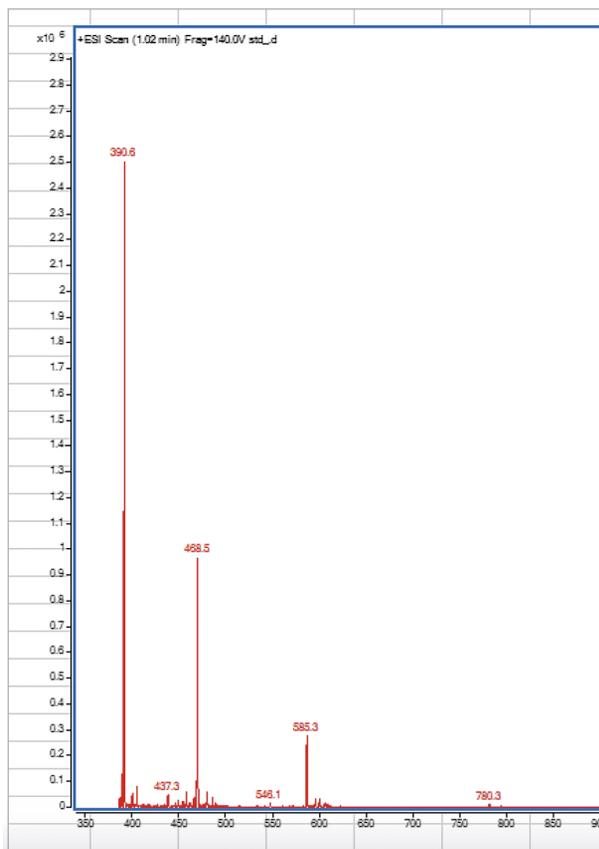


Рис. 2. Масс-спектр b-LTP, снятый в режиме «электроспрей» (ESI).

Fig. 2. ESI mass spectrum of b-LTP.

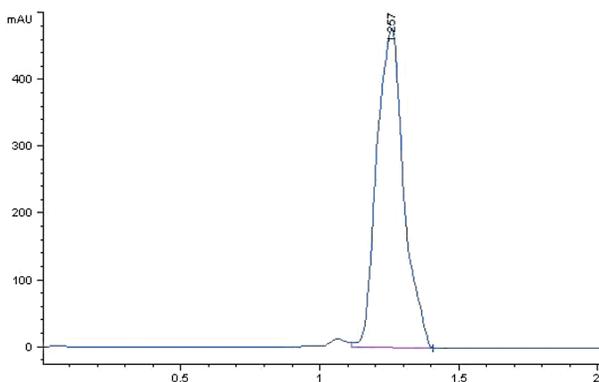


Рис. 3. Хроматограмма вспомогательного вещества — катионного пептида b-LTP.

Fig. 3. Chromatogram of the excipient — cationic peptide of b-LTP.

довательской организации. Методика удовлетворяла основным критериям приемлемости по разделам специфичность, линейность, предел обнаружения, предел количественного определения, повторяемость и внутрилабораторная прецизионность, точность, аналитическая область методики, стабильность, устойчивость.

#### Молекулы миРНК

В результате проведенного анализа подлинности миРНК методом MALDI-TOF полученные значения масс анализируемых образцов сопоставляются с расчетными массами для соответствующих олигонуклеотидов. В масс-спектре должны присут-

ствовать пики молекулярных ионов  $m/z = 6671 \pm 7$  и  $6618 \pm 7$  для siL4-153 (для смысловой и антисмысловой последовательности соответственно) и  $m/z = 6630 \pm 7$  и  $6689 \pm 7$  для siL13-395 (для смысловой и антисмысловой последовательности соответственно). При соответствии расчетных и наблюдаемых масс в рамках погрешности методики (не более 0,1 %) делается вывод о подлинности компонентов ФС (молекул миРНК siL4-153 и siL13-395). Полученные спектры приведены на рисунках 4 и 5.

При подборе хроматографических условий для определения чистоты миРНК в составе ФС представленные хроматографические условия не являются идеальными, в частности, достичь хроматографического разделения молекул миРНК (siL4-153 и siL13-395) не удалось. Однако в этом случае методика определения чистоты молекул миРНК полностью совпадает с методикой определения ВВ, что делает ее очень удобной для использования в качестве методики определения чистоты и подлинности готового ЛС. В результате анализа чистоты ФС методом ВЭЖХ-УФ на представленной хроматограмме четко видны пики, соответствующие siL4-153 и siL13-395. Значение процентного содержания миРНК в навеске испытуемой ФС находилось в пределах от 95 до 105 %. Прочие пики или пики несимметричной формы отсутствовали. Типичная хроматограмма приведена на рисунке 6. Методика удовлетворяла основным валидационным критериям приемлемости по разделам специфичность, линейность, предел обнаружения, предел количественного определения, повторяемость и внутрилабораторная прецизионность, точность, аналитическая область методики, стабильность, устойчивость.

#### Лекарственное средство

Основная проблема при совместном присутствии в составе лекарственного средства ФС и ВВ — достичь наилучших значений параметров пригодности хроматографической системы. В первую очередь — разрешения. Кроме того, пики, соответствующие ФС и ВВ, должны быть легко идентифицируемы на хроматограммах. В связи с этим были испытаны различные хроматографические системы и сравнены параметры их пригодности.

Основным параметром хроматографической системы, влияющим на разрешение, число теоретических тарелок и асимметрию пика, является состав подвижной фазы. Были разработаны несколько хроматографических систем с различным составом подвижной фазы. В результате выбор был сделан в пользу состава фосфатный буфер (pH 7,4) — ацетонитрил в соотношении 25:75, так как именно при этих условиях возможно достичь разделения компонентов ВВ и ФС, что необходимо для использования разработанного метода для стандартизации и контроля качества готового ЛС на этапе производства. В результате анализа чистоты ЛС методом ВЭЖХ-УФ на представленной хроматограмме четко видны пики, соответствующие компонентам ВВ и ФС. Значение процентного содержания компонентов в навеске испытуемого ЛС находилось в пределах от 95 до 105 %. Прочие пики или пики несимметричной формы отсутствовали. Типичная хроматограмма приведена на рисунке 7. Методика удовлетворяла основным валидационным критериям приемлемости по разделам специфичность, линейность, предел обнаружения, предел количественного определения, повторяемость и внутрилабораторная прецизионность, точность, аналитическая область методики, стабильность, устойчивость.

#### Заключение

Для контроля качества лекарственных средств на основе пептидных соединений необходимо разработать комплексный

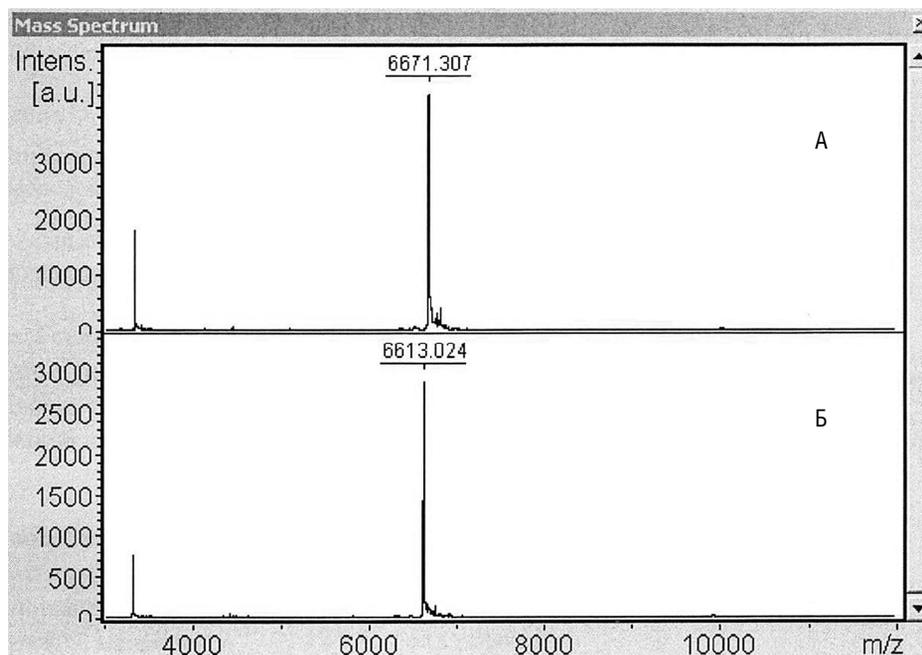


Рис. 4. Масс-спектрометрический анализ siIL4-153: А — анализ смысловой цепи siIL4-153, Б — анализ антисмысловой цепи siIL4-153.

Fig. 4. Mass-spectrometric analysis of siIL4-153: A — analysis of the sense chain of siIL4-153, Б — analysis of the antisense chain of siIL4-153.

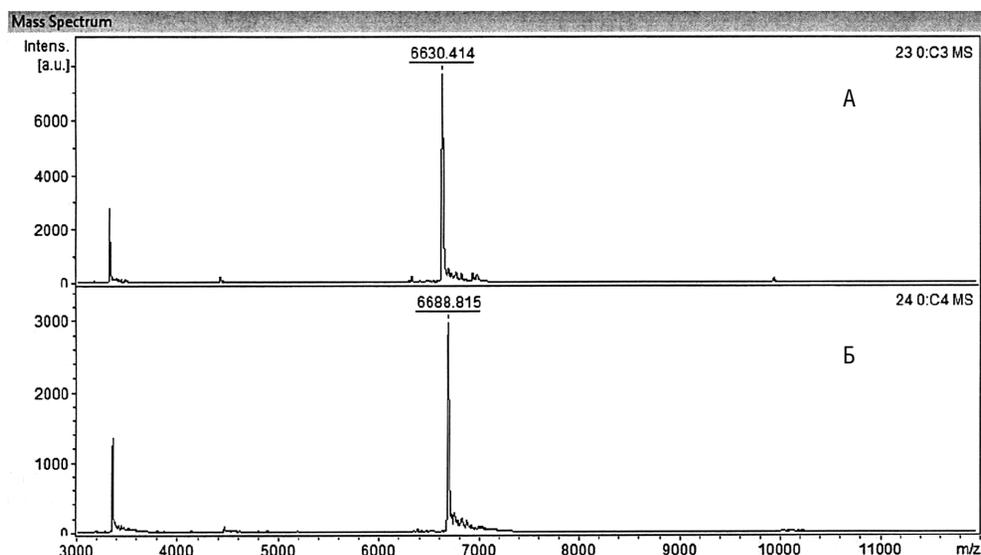


Рис. 5. Масс-спектрометрический анализ siIL13-395: А — анализ смысловой цепи siIL13-395, Б — анализ антисмысловой цепи siIL13-395.

Fig. 5. Mass-spectrometric analysis of siIL13-395: A — analysis of the sense chain of siIL13-395, Б — analysis of the antisense chain of siIL13-395.

подход с использованием современных инструментальных методов. Разработанные методики должны быть точны и воспроизводимы с целью использования в лабораторной практике для постоянного контроля на производстве. Ввиду большей селективности и точности для определения подлинности ВВ — пептида b-LTP в основной форме использовали методику на основе масс-спектрометрии. Проведена валидация разработанной методики. Также была разработана методика определения чистоты ВВ, которая основана на методе ВЭЖХ с УФ-детекцией.

Разработана методика определения подлинности ФС, основанная на методе масс-спектрометрии. В ходе разработки методики был осуществлен подбор параметров сокристаллизации матрицы и исследуемых образцов ФС при проведении масс-спектрометрии. Разработана методика определения чистоты ФС. В ходе разработки методики был проведен подбор условий хроматографирования.

Была создана методика анализа ЛС на основе метода ВЭЖХ с УФ-детектированием. Выбор данного метода анализа ЛС обусловлен удобством, заключающимся в одновременном

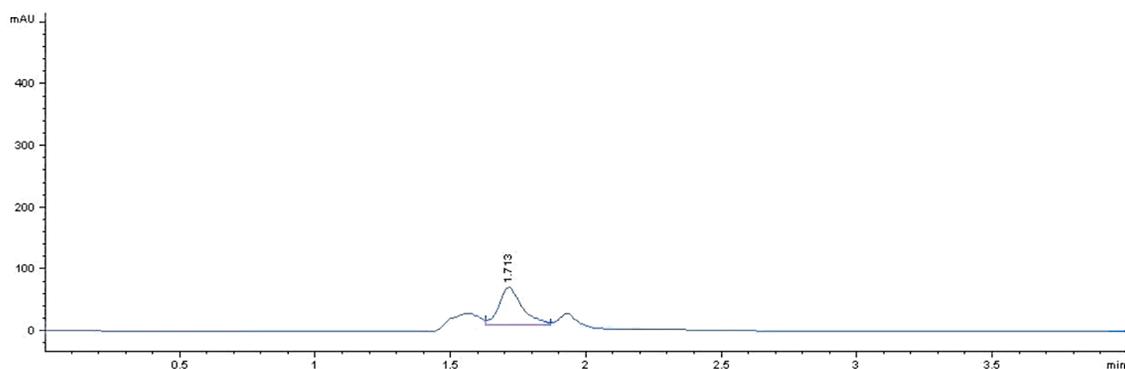


Рис. 6. Хроматограмма образца фармацевтической субстанции, содержащего siL4-153 и siL13-395.  
Fig. 6. Chromatogram of an API sample containing siL4-153 and siL13-395.

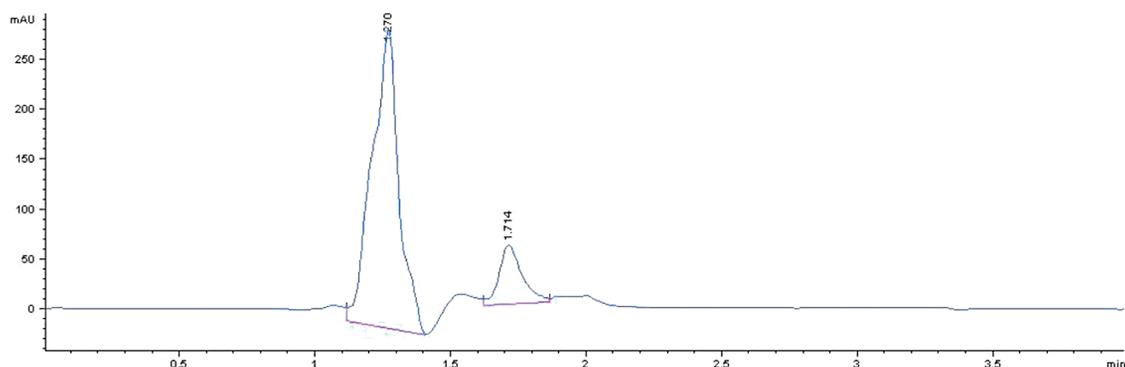


Рис. 7. Хроматограмма образца лекарственного средства.  
Fig. 7. Chromatogram of a medicinal product sample.

детектировании подлинности и чистоты обоих компонентов ЛС (ФС — молекул миРНК и ВВ — катионного пептида b-LTP). При этом подлинность оценивалась по времени удерживания основных пиков, соответствующих ВВ и ФС, а чистота оценивалась по площади основных пиков, соответствующих ВВ и ФС.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

**Acknowledgments.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00023-18-02 and was supported by the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590049-0).

**Информация об отсутствии конфликта интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

### Литература / Reference

- Whangbo JS, Hunter CP. Environmental RNA interference. *Trends Genet.* 2008;24(6):297–305. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.03.007>
- Rosenthal JJ. The emerging role of RNA editing in plasticity. *J Exp Biol.* 2015;218(Pt 12):1812–21. <https://doi.org/10.1242/jeb.119065>

- Шиловский ИП, Мазуров ДВ, Шершакова НН, Гасанов ВА, Хаитов МР. Синтетические siRNA эффективно подавляют экспрессию провоспалительного цитокина интерлейкина-4 мыши *in vitro*. *Иммунология.* 2012;2:66–70. [Shilovskiy IP, Mazurov DV, Shershakova NN, Gasanov VA, Khaitov MR. siRNA suppresses the expression of murine proinflammatory interleukine-4 *in vitro*. *Immunologiya = Immunology.* 2012;2:66–70 (In Russ.)]
- Khaitov MR, Shilovskiy IP, Nikonova AA, Shershakova NN, Kamyshnikov OY, Babakhin AA, et al. Small interfering RNAs targeted to interleukin-4 and respiratory syncytial virus reduce airway inflammation in a mouse model of virus-induced asthma exacerbation. *Hum Gene Ther.* 2014;25(7):642–50. <https://doi.org/10.1089/hum.2013.142>
- Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature.* 2004;431(7006):343–9. <https://doi.org/10.1038/nature02873>
- Manjila SB, Baby JN, Bijin EN, Constantine I, Pramod K, Valsalakumari J. Novel gene delivery systems. *Int J Pharm Investig.* 2013;3(1):1–7. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.108958>
- Кутин АА, Мастеркова ТВ, Яшкир ВА, Меркулов ВА, Ваганова ОА. Хромато-масс-спектрометрия: использование для идентификации лекарственных субстанций и примесей. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2013;(2):12–4. [Kutin AA, Masterkova TV, Yashkir VA, Merkulov VA, Vaganova OA. UPLC/MS/MS method for identification of drug substances and impurities. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.* 2013;(2):12–4 (In Russ.)]

## Об авторах

**Красных Людмила Михайловна**, канд. биол. наук, начальник отдела клинической фармакокинетики Центра клинической фармакологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-3650-6014>

**Смирнов Валерий Валерьевич**, канд. фарм. наук, ведущий аналитик отдела клинической фармакокинетики Центра клинической фармакологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России; заведующий лабораторией № 73 клинической фармакологии ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-8232-6682>

**Раменская Галина Владиславовна**, д-р фарм. наук, ведущий аналитик отдела взаимодействия лекарственных средств и рациональной фармакотерапии Центра клинической фармакологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8779-3573>

**Василенко Галина Федоровна**, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела клинической фармакокинетики Центра клинической фармакологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-7940-1664>

**Шиловский Игорь Петрович**, д-р биол. наук, заведующий лабораторией № 75 противовирусного иммунитета ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, **ORCID:** <http://orcid.org/>

**Хаитов Муса Рахимович**, член-корреспондент РАН, д-р мед. наук, профессор, директор ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, **ORCID:** <http://orcid.org/>

Поступила 04.07.2018

Принята к публикации 09.08.2018

## Authors

**Lyudmila M. Krasnykh**, Candidate of Biological Sciences, Head of the Department of Clinical Pharmacokinetics of the Clinical Pharmacology Centre of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-3650-6014>

**Valeriy V. Smirnov**, Candidate of Pharmaceutical Sciences, Leading Analyst of the Department of Clinical Pharmacokinetics of the Clinical Pharmacology Centre of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia; Head of Laboratory No. 73 for Clinical Pharmacology of the FSBI NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-8232-6682>

**Galina V. Ramenskaya**, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Leading Analyst of the Department of Drug Interactions and Rational Pharmacotherapy of the Clinical Pharmacology Centre of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8779-3573>

**Galina F. Vasilenko**, Candidate of Biological Sciences, Leading Research Associate of the Department of Clinical Pharmacokinetics of the Clinical Pharmacology Centre of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-7940-1664>

**Igor P. Shilovsky**, Doctor of Biological Sciences, Head of Laboratory No. 75 for Antiviral Immunity of the FSBI NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/>

**Musa R. Haitov**, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the FSBI NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/>

Received 4 July 2018

Accepted 9 August 2018

## «Микробиологическая чистота» сухих питательных сред, используемых для оценки стерильности иммунологических лекарственных препаратов

С. М. Суханова, Н. Е. Захарова\*

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

Несоответствие лекарственных средств требованиям испытания по показателю «Стерильность» устанавливается при обнаружении роста микроорганизмов, определяемого визуально по наличию мутности, осадка, хлопьев и других изменений питательной среды (ПС). Определяющим фактором, позволяющим достоверно установить наличие изменений в посевах, подозрительных на контаминацию, является качество используемых ПС, а именно их прозрачность, а также отсутствие в них загрязнений, обнаруживаемых при микроскопии мазков ПС. Присутствие таких загрязнений особенно затрудняет интерпретацию результатов испытания иммунологических лекарственных препаратов (ИЛП), вызывающих помутнение среды вследствие особенностей своего состава, в частности живых бактериальных вакцин. В основу статьи положены исследования качества образцов сухих ПС, рекомендуемых Государственной фармакопеей Российской Федерации XIII издания ОФС.1.2.4.0003.15 для проведения испытания на стерильность ИЛП, по показателям «Прозрачность» и «Микробная обсемененность». Установлено, что среды обсеменены различной микрофлорой, в том числе и патогенной. Учитывая отсутствие в сертификатах качества и в технической документации на компоненты ПС и на сухие ПС большинства отечественных и зарубежных производителей информации об уровне их допустимой обсемененности, обоснована необходимость оценивать их качество по показателю «Микробная обсемененность». Изучена возможность улучшения качества изготовленных промышленным способом сухих ПС на этапе приготовления.

**Ключевые слова:** питательные среды; микробная обсемененность; микробиологическая безопасность; стерильность; оценка качества; мутность; контаминация; иммунологические лекарственные препараты

**Для цитирования:** Суханова СМ, Захарова НЕ. «Микробиологическая чистота» сухих питательных сред, используемых для оценки стерильности иммунологических лекарственных препаратов. БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2018;18(3):191–197. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-191-197>

\* Контактное лицо: Захарова Наталия Евгеньевна; Zaharova@expmed.ru

## Microbial Quality of Dehydrated Media Used in the Sterility Testing of Immunobiological Medicinal Products

S. M. Sukhanova, N. E. Zakharova\*

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

Medicinal products fail sterility testing if visual observation shows the growth of microorganisms that manifests itself as turbidity, sedimentation, flocculation and other changes in the growth medium. A key factor allowing robust determination of changes in the culture that may be suspected of contamination is the quality of growth media used, namely their transparency, and absence of foreign matter detectable by microscopic examination of the growth media smears. The presence of such foreign matter makes it especially difficult to interpret the results of testing of immunobiological products, namely live bacterial vaccines, because they cause turbidity of the media due to their specific composition. The article dwells upon the results of testing (in terms of Transparency and Microbial content) of dehydrated growth media recommended by the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th ed., General monograph 1.2.4.0003.15 for sterility testing of immunobiological medicinal products. The study revealed the presence of microorganisms, including pathogenic ones, in the growth media. In view of the fact that certificates of analysis and technical documentation accompanying components of growth media and dehydrated growth media produced by most national and foreign manufacturers do not contain any data on the acceptable levels of microorganisms it is argued that these products have to be tested for microbial content. The study also investigated the ways of improving the quality of commercial dehydrated growth media at the preparation stage.

**Key words:** growth media; microbial content; microbiological safety; sterility; quality evaluation; turbidity; contamination; immunobiological medicinal products

**For citation:** Sukhanova SM, Zakharova NE. Microbial quality of dehydrated media used in the sterility testing of immunobiological medicinal products. BИOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BИOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2018;18(3):191–197. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-191-197>

\* Contact person: Nataliya E. Zakharova; Zaharova@expmed.ru

Достоверность результатов испытания лекарственных средств (ЛС) обеспечивается применением надежных методов, тщательностью их проведения, а также верной интерпретацией полученных данных. Правильная оценка результатов исследования ЛС по показателю «Стерильность» позволяет судить о его микробиологической безопасности, а также является важнейшим подтверждением соответствия условий производства требованиям надлежащих практик (Good Manufacturing Practice, GMP и Good Laboratory Practice, GLP). В соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации XIII издания (ГФ РФ XIII) несоответствие ЛС требованиям испытания по показателю «Стерильность» устанавливается при обнаружении роста микроорганизмов, определяемого визуально по наличию мутности, осадка, хлопьев и других изменений питательной среды (ПС) и подтверждаемого микроскопическим исследованием [1].

Важным фактором, позволяющим достоверно установить наличие изменений в посевах, подозрительных на контаминацию, является качество используемых ПС, а именно их прозрачность, а также отсутствие в них загрязнений, обнаруживаемых при микроскопии мазков ПС. Присутствие таких загрязнений особенно затрудняет интерпретацию результатов испытания иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП), в частности живых бактериальных вакцин, вызывающих вследствие особенностей своего состава помутнение среды. Наиболее значимо соответствие качества по этим показателям для жидких и полужидких сред, поскольку наличие мутности и/или опалесценции может быть принято в стерильной среде за диффузный рост контаминанта, и наоборот, пророст может быть расценен как свойство среды, что одинаково приводит к получению недостоверных результатов анализа [2, 3].

В соответствии с требованиями ГФ РФ XIII, для контроля стерильности ИЛП рекомендовано использовать тиогликолевую и соево-казеиновую ПС, приготовленные в лаборатории из отдельных компонентов или из сухих сред промышленного производства. Приготовленные в лаборатории ПС необходимо проверять на стерильность и определять их ростовые свойства. Дополнительные требования к качеству ПС не приводятся [1].

Наш опыт наблюдения за свойствами ПС, приготовленных из сухих препаратов в соответствии с инструкцией по их применению, в частности тиогликолевой среды, свидетельствует, что они не всегда оказываются прозрачными, в ряде случаев после стерилизации в толще среды может появляться довольно сильная опалесценция, располагающаяся сегментировано. Данное отклонение не является критичным и допускается требованиями к качеству согласно инструкциям по применению и сертификатам производителей, однако значительно затрудняет интерпретацию результатов. При микроскопии стерильной тиогликолевой среды в мазках могут обнаруживаться окрашиваемые загрязнения, схожие с фрагментами клеток и обусловленные, по всей видимости, исходной микробной загрязненностью сухой среды. Поскольку питательную ценность ПС обеспечивают ингредиенты животного и/или растительного происхождения (гидролизаты казеина и соевой муки, пептон, дрожжевой экстракт), среды сами могут служить субстратом для размножения различных микроорганизмов и могут также накапливать токсичные продукты их жизнедеятельности, приводящие к ухудшению качества ПС.

Одной из причин, оказывающих влияние на качество ПС, является обсемененность агара, входящего в их состав. Агар, содержащий более  $10^4$  колониеобразующих единиц (КОЕ) термоустойчивой микрофлоры на 1 г, не может быть использован в производстве ПС, так как среды, не подвергающиеся стерилизации,

прорастают, а в стерилизуемых средах подавляется рост искомых тест-штаммов как в количественном выражении, так и в изменении их морфологических свойств [4]. Для изготовления ПС используют агар микробиологический, соответствующий требованиям ГОСТ 17206-96. В 1 г сухого агара такого качества не допускается наличие плесневых грибов, а количество клеток мезофильной аэробной и факультативно-анаэробной термостабильной микрофлоры в 1 г агара может варьировать в зависимости от сорта (500 клеток — сорт экстра, 2000 — высший сорт, 5000 — первый сорт). Так, например, в составе питательного агара агара сорта экстра с бактериальной контаминацией не более 500 клеток обеспечивает рост регламентированных тест-штаммов, в том числе и *Pseudomonas aeruginosa*, используемых для оценки ростовых свойств тиогликолевой среды при испытании стерильности ЛС [5].

Качество ПС зависит от ее состава, свойств сырья, технологии изготовления [6] и может быть ухудшено при приготовлении, в частности, растворением ее деионизованной водой с высоким содержанием микроорганизмов [7].

В настоящее время требования к качеству ПС регламентируются ГОСТ Р 51088-2013 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации» [8], ГОСТ Р ЕН 12322-2010 «Изделия медицинские для диагностики in vitro. Питательные среды для микробиологии. Критерии функциональных характеристик питательных сред» [9], а также МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [10]. В соответствии с этими документами, качество ПС зависит от качества основных ингредиентов, точной формулы и правильности изготовления, адекватного удаления микробного загрязнения, соответствующей упаковки и хранения, которое должно быть подтверждено. В технической документации на изделия медицинского назначения, к которым относятся ПС, должны быть регламентированы требования к компонентам (реагентам), входящим в изделия, с указанием квалификации, а также сорта либо марки. Учитывая, что на сегодняшний день, в большинстве случаев, информация об уровне допустимой обсемененности ПС и их компонентов в сертификатах качества и в технической документации отечественных и зарубежных производителей отсутствует, получение данных о микробиологической чистоте ПС является актуальным.

Целью работы являлось изучение микробной обсемененности питательных сред, рекомендуемых для проведения испытания иммунобиологических лекарственных препаратов на стерильность в соответствии с ГФ РФ XIII ОФС.1.2.4.0003.15.

В задачи исследования входило:

1. Оценить влияние первичных загрязнений ПС на результаты исследования качества ИЛП по показателю «Стерильность».
2. Установить уровень микробной обсемененности сухих ПС различных производителей.
3. Провести анализ микробного профиля загрязнений препаратов сухих ПС.
4. Изучить влияние этапов приготовления ПС на прозрачность и их микробную обсемененность.
5. Предложить возможные пути снижения первичных загрязнений коммерческих сухих ПС.

### Материалы и методы

Объектами настоящего исследования были образцы сухих ПС: тиогликолевая среда — 4 серии (образцы № 1, 2, 3, 4), соево-казеиновый бульон — 2 серии (образцы № 5, 6) отечествен-

ного и зарубежного производства (ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора), HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. (Индия), Merck KGaA (Германия) с паспортами (сертификатами) качества и действующими сроками годности.

Микробную обсемененность и выявление микроорганизмов из 10 г каждого образца оценивали в соответствии с требованиями ГФ РФ XIII ОФС.1.2.4.0002.15 [11], используя питательные среды: № 1-ГРМ, № 3-ГРМ, RVS-бульон производства ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора, а также триптон-соевый бульон, агар Сабуру с глюкозой и хлорамфениколом, цетримидный агар, солевой агар с маннитом производства HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. (Индия). ПС готовили согласно инструкциям по их применению. Ростовые свойства, стерильность и чистоту розлива ПС оценивали по ГФ РФ XIII ОФС.1.2.4.0003.15 [1]. Величину микробной обсемененности определяли методом предельного разведения с подсчетом наиболее вероятного числа (НВЧ) микроорганизмов в 1 г ПС [12]. Идентификацию микроорганизмов проводили на бактериологическом автоматическом анализаторе VITEK® 2 Compact 30 производства bioMérieux (Франция) в соответствии с инструкцией производителя.

Для анализа влияния этапов приготовления (растворение, фильтрация, кипячение) на внешний вид, прозрачность и НВЧ использовали тиогликолевую среду, образец № 2. Навеску ПС в количестве, согласно указанному в инструкции по применению (31,0 г/л), растворяли в воде очищенной. Образцы получали, используя различные стадии приготовления: кипячение (2 мин) и фильтрацию (фильтр ватно-марлевый, фильтр бумажный «Синяя лента» (ТУ 2642-001-13927158-2003) или фильтровальная бумага лабораторной марки «Ф» (ГОСТ 12026-76)).

Прозрачность растворов образцов ПС, охлажденных до 18–25 °С, оценивали визуально в проходящем свете на темном фоне и фотоколориметрически, определяя оптическую плотность с использованием фотоэлектроколориметра КФК-2 при  $\lambda = 540$  нм [10, 13]. Мазки (по 3 с одного образца) ПС окрашивали по Граму и микроскопировали с иммерсией при увеличении  $\times 1000$ , просматривая не менее 10 полей зрения.

### Результаты и обсуждение

Наличие мутности в приготовленных ПС не позволяет однозначно интерпретировать результаты дальнейших испытаний ИЛП на отсутствие контаминации. Для оценки влияния возможных артефактов на результаты исследования нами были изучены окрашенные мазки образцов сухих ПС, растворенных в воде очищенной, трех наиболее известных производителей: ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. и Merck KGaA. При микроскопировании мазков во всех образцах были обнаружены живые бактериальные клетки, а также в разной степени окрашенные полиморфные частицы среды, которые, по всей видимости, представляют собой разрушенные клетки, белковые преципитаты, агар-агар и т.п., но которые достаточно трудно отдифференцировать от живых бактериальных клеток или их спор (рис. 1).

После стерилизации образцов в мазках сохранялись объекты, похожие на контаминанты, несмотря на то что качество ПС, приготовленных из исследуемых препаратов, в отношении стерильности и ростовых свойств было предварительно подтверждено и соответствовало требованиям ГФ РФ XIII ОФС.1.2.4.0003.15 [1]. Несомненно, что данный факт может отразиться на ходе испытания и на принятии решения о ка-

честве ИЛП. Так, при наличии в мазках посевов вакцинных препаратов, содержащих живые культуры микроорганизмов, не типичных по окраске и морфологии бактерий, необходимо проводить их дальнейшую идентификацию, например с диагностическими иммуноглобулинами. Более того, интерпретация результатов микроскопии посевов в средах такого качества может привести как к ложноположительному, так и к ложноотрицательному результату.

В ходе дальнейшего исследования выявленных первичных загрязнений сухих ПС был изучен их микробный профиль и уровень обсемененности. Во всех испытанных образцах (№ 1–6) тиогликолевой и соево-казеиновой ПС был выявлен рост аэробных микроорганизмов с НВЧ от 75 до 15 000 КОЕ/г. Более того, в процессе хранения отдельных ПС (в течение 6 мес.) установлено увеличение НВЧ в 10 раз и более чем в 100 раз после окончания их срока годности, при соблюдении условий хранения. В соево-казеиновой среде рост наблюдался в виде диффузного помутнения, пленки на поверхности и осадка на дне, а на плотной среде № 1 ГРМ — в виде сухих матовых плоских колоний с ровными и фестончатыми краями с желтым или оранжевым пигментом и без пигмента, блестящих круглых гладких выпуклых колоний с ровным краем (рис. 2).

Наряду с этим, при посеве на соответствующие дифференцирующие среды ни в одном из образцов не был обнаружен рост дрожжевых и плесневых грибов, энтеробактерий, устойчивых к желчи, и *Escherichia coli*. Микроскопия окрашенных по Граму мазков из выросших на плотной среде колоний микроорганизмов подтвердила наличие грамположительных и грамотрицательных палочек и кокков, в том числе и споробразующих. При последующей идентификации, в том числе с помощью бактериологического автоматического анализатора VITEK® 2 Compact 30, установлено, что выделенные микроорганизмы принадлежат к родам *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Dermacoccus*, *Kytococcus*. Микроорганизмы рода *Micrococcus* (*Dermacoccus*, *Ky-*

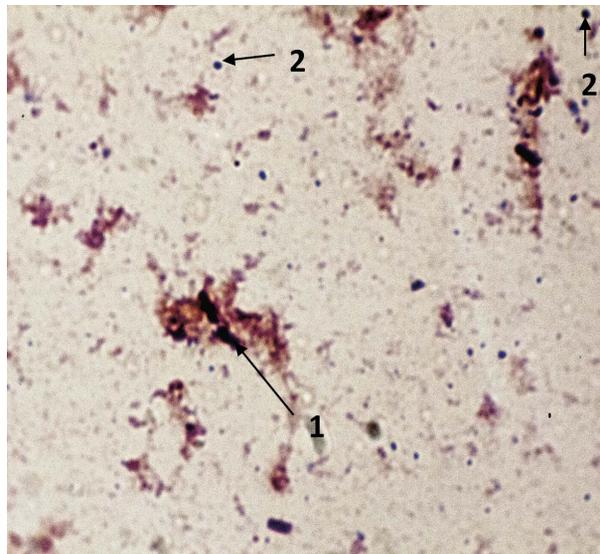


Рис. 1. Образец сухой тиогликолевой среды, растворенной в воде очищенной. Окраска по Граму (увеличение  $\times 1000$ ); 1 — грамотрицательные крупные палочковидные бактериальные клетки, 2 — предположительно, грамположительные кокки.  
Fig. 1. A sample of dehydrated thioglycollate medium dissolved in purified water. Gram staining (magnification 1000 $\times$ ); 1 — gram-negative large rod-shaped bacterial cells, 2 — presumably gram-positive cocci.

*tococcus*) устойчивы к высушиванию и нагреванию, способны к развитию при низких температурах, а также разлагают белки с образованием аммония и мочевины до аммонийных солей, редуцируют нитраты и нитриты до свободного азота. Кроме того, микроорганизмы выделенных родов могут вызывать инфекции респираторного и желудочно-кишечного тракта, эндокардиты, септицемию и сепсис, нагноения кожных покровов, оппортунистические инфекции [14–21]. Таким образом, результаты анализа микробного профиля показали, что выделенные из образцов ПС микроорганизмы могут снижать питательную ценность самих ПС, приводить к образованию токсичных продуктов, ухудшая тем самым качество ПС, а также могут представлять потенциальную опасность для человека.

Сравнительный анализ состава исследуемых ПС показал, что, несмотря на некоторые различия в содержании компонентов биологического происхождения (гидролизат казеина — 15–17 г/л, дрожжевой экстракт — 3–5 г/л), а также наличие в образцах тиогликолевой среды агара от 0,2 до 0,75 г/л, обуславливающих возможность присутствия компонентов, служащих источником загрязнения, достоверных различий, в рамках данного исследования, по влиянию на общую обсемененность конкретного компонента не было выявлено. Очевидно, что качество ПС определяется совокупностью факторов производства и в первую очередь качеством отдельных входящих в их состав компонентов.

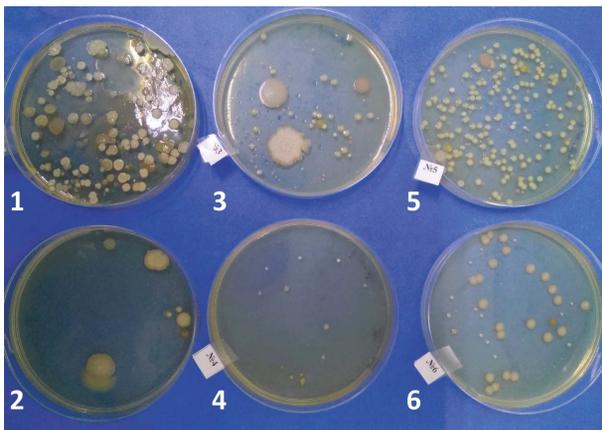
Поскольку выявленная микробная контаминация обусловлена первичным загрязнением компонентов ПС, ее снижение при анализе рисков должно стать приоритетной задачей для производителей. С целью повышения качества сырья, полуфабрикатов может быть предложена оценка их качества по показателю «Микробная обсемененность» на этапе производства или при входном контроле в производстве самих ПС. В требованиях по микробиологической чистоте основ для ПС, безусловно, должна быть заложена норма: отсутствие таких патогенных для человека микроорганизмов, как *E. coli*, *Salmonella* spp., *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Candida albicans*, *Clostridium* spp. Достаточно обоснованной и приемлемой для сред и их компонентов, используемых в испытании стерильности ПС, может быть норма, принятая для агара микробиологического сорта экстра. Конкретные нормы по общему числу аэробных микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов должны быть

установлены с учетом безопасности при производстве, рисков при применении ПС, а также сохранения ее качества в течение срока годности, в том числе по уровню обсемененности.

С учетом полученных результатов проведено исследование влияния этапов приготовления ПС на прозрачность и микробную обсемененность. Согласно МУК 4.2.2316-08, сухие среды готовят в соответствии с инструкцией по применению, причем бульоны, как правило, фильтруют через бумажный фильтр, а агаровые среды — через ватно-марлевый. Анализ инструкций по применению исследуемых ПС показал, что способ приготовления аналогичных сред из сухих препаратов различается у разных производителей. Так, например, тиогликолевую среду одного производителя перед стерилизацией следует растворить в воде и прокипятить, а другого — после кипячения необходимо дополнительно профильтровать, однако тип фильтра обычно не указывается. Мы попытались оценить влияние этапов приготовления (кипячение, фильтрование) не только на прозрачность, но и на степень микробной обсемененности на примере тиогликолевой среды, для которой согласно инструкции по применению необходимо фильтрование (образец № 2). Выбор тиогликолевой среды был обусловлен также и тем фактором, что для оценки качества ИЛП по показателю «Стерильность» данная среда может быть использована в качестве единственной, «универсальной», что обуславливает особые требования к ее качеству.

Сравнительное изучение качества среды было проведено на образцах, полученных растворением навески ПС (этап 1) с последующими стадиями приготовления: фильтрование через ватно-марлевый фильтр (этап 2), через бумажные фильтры двух видов (фильтр «Синяя лента» («А») и по ГОСТ 12026-76 («Б»)), предназначенные для проведения лабораторных работ, но имеющих различные фильтрующие свойства (этапы 3 и 4), кипячение (этап 5), кипячение и фильтрование через ватно-марлевый фильтр (этап 6) или через бумажные фильтры (этапы 7 и 8) (табл. 1). Результаты свидетельствуют, что на стадии предварительного фильтрования через ватно-марлевый фильтр происходит освобождение раствора от крупных механических частиц, снижающее его мутность, но не влияющее на обсемененность. При замене на этой стадии ватно-марлевого фильтра на фильтрованную бумагу (этапы 3 и 4) жидкость становится прозрачной, а обсемененность после пропускания через фильтр «А» снижается примерно в 1,8–2 раза, а через фильтр «Б» — в 10 раз. Интересно, что такое же снижение обсемененности на порядок наблюдали и при использовании только стадии кипячения в течение 2 мин, при этом последующее фильтрование через ватно-марлевый фильтр было не результативно. Проведение этапа фильтрования через бумажный фильтр «А» после кипячения позволило снизить обсемененность дополнительно примерно в 45 раз, а через фильтр «Б» — в 100 раз. Последовательность проведения стадий фильтрования и кипячения при приготовлении не влияла на прозрачность и обсемененность среды.

Уменьшение мутности, подтвержденное фотоколориметрически, наблюдали в образцах, полученных фильтрованием через фильтровальную бумагу до процедуры кипячения. Выявлено, что после кипячения, а затем и после стерилизации во всех образцах отмечается повышение оптической плотности (за счет перехода растворов в гелеобразное состояние), не коррелирующее с изменением их обсемененности, при этом внешний вид всех образцов представляет собой слабо опалесцирующую гелеобразную жидкость. Использование фотоколориметрической оценки изменения мутности ПС в процессе ее приготовления было неинформативно.



**Рис. 2.** Рост аэробных микроорганизмов, выделенных из образцов тиогликолевой среды (1–4) и соево-казеинового бульона (5, 6), на плотной среде № 1-ГРМ.

**Fig. 2.** Growth of aerobic microorganisms, isolated from the thioglycollate medium (1–4) and casein soybean digest broth (5, 6) on the solid medium No. 1-GRM (fish flour hydrolysate).

**Таблица 1.** Влияние этапов приготовления тиогликолевой среды на ее прозрачность и обсемененность  
**Table 1.** Influence of the stages of thioglycollate medium preparation on its clarity and microbial content

Этапы приготовления среды из сухого образца	Внешний вид полученного образца тиогликолевой среды	Оптическая плотность ( $D = 540 \text{ нм}$ )	НВЧ в 1 г
1. Растворение	Непрозрачная жидкость	0,024±0,002 (0,050±0,002)*	4500
2. Фильтрация (ватно-марлевый фильтр)	Опалесцирующая жидкость	0,020±0,001 (0,050±0,002)*	4500
3. Фильтрация (бумажный фильтр «Синяя лента»)	Прозрачная жидкость	0,020±0,001 (0,050±0,001)*	2500
4. Фильтрация (фильтровальная бумага ГОСТ 12026–76)	Прозрачная жидкость	0,018±0,002 (0,050±0,002)*	450
5. Кипячение в течение 2 мин	Слабо опалесцирующая жидкость	0,043±0,002 (0,135±0,002)*	450
6. Кипячение + фильтрация (ватно-марлевый фильтр)	Слабо опалесцирующая жидкость	0,042±0,003 (0,130±0,002)*	450
7. Кипячение + фильтрация (фильтр «Синяя лента»)	Слабо опалесцирующая жидкость	0,042±0,003 (0,130±0,002)*	9,5
8. Кипячение + фильтрация (фильтровальная бумага ГОСТ 12026–76)	Слабо опалесцирующая жидкость	0,041±0,002 (0,095±0,003)*	4,5

Примечание. НВЧ — наиболее вероятное число.

\*Значение оптической плотности образца после стерилизации.

Возможность уменьшения исходного загрязнения сухого образца коммерческой ПС при приготовлении была подтверждена микроскопически исследованием мазков стерильных образцов среды, окрашенных по Граму. В образцах, подготовленных в соответствии с инструкцией по применению фильтрованием через фильтры «А» и «Б», загрязнения практически отсутствовали. Несмотря на то что выполнение процедуры фильтрования через бумажный фильтр с практической точки зрения гораздо сложнее, чем через ватно-марлевый, особенно при больших объемах среды, именно ее применение повышает выход приготавливаемой среды и улучшает за счет удаления контаминантов ее качество. При необходимости для снижения уровня первичной загрязненности коммерческих сухих ПС рекомендуется подбирать материалы для фильтрования, обеспечивающие требуемое качество.

## Выводы

1. Подтверждено влияние первичных загрязнений ПС на результаты исследования качества ИЛП по показателю «Стерильность».

2. Установлено, что уровень микробной обсемененности сухих ПС отечественных и зарубежных производителей, используемых для оценки стерильности ИЛП, составил от 75 до 15000 КОЕ/г.

3. Анализ микробного профиля загрязнений препаратов сухих ПС показал наличие в них микроорганизмов, в том числе и патогенных для человека, принадлежащих к родам *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Dermatococcus*, *Kytococcus*.

4. Установлено, что этапы кипячения и фильтрования позволяют повысить прозрачность, а также до 100 раз снизить уровень микробной обсемененности ПС в процессе их приготовления из сухого препарата.

5. Для снижения микробных загрязнений сухих ПС при их производстве обоснована необходимость учитывать качество сырья по уровню обсемененности. Предложены подходы

к установлению нормативных требований допустимого уровня микробной обсемененности ПС и их полуфабрикатов.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

**Acknowledgments.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00023-18-02 and was supported by the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590046-9).

**Информация об отсутствии конфликта интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## Литература / References

- Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 «Стерильность». Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1, М.; 2015. [General monograph 1.2.4.0003.15 Sterility. The State pharmacopoeia of Russian Federation 13th ed. V. 1. Moscow; 2015 (In Russ.)]
- Мовсесянц АА, Бондарев ВП, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Шимчук ЛФ. Стандарты качества иммунобиологических лекарственных препаратов — новое в Государственной фармакопее Российской Федерации. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2016;(2):38–41. [Movsesyants AA, Bondarev VP, Olefir YuV, Merkulov VA, Shimchuk LF. Quality standards for immunobiological medicinal products — new texts in the State pharmacopoeia of the Russian Federation. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2016;(2):38–41 (In Russ.)]
- Озерцовский НА, Затолочина КЭ, Снегирева ИИ. Предложения по профилактике нежелательных реакций при

- применении иммунобиологических лекарственных препаратов в Российской Федерации. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2015;(1):25–9. [Ozeretskovsky NA, Zatolochina KE, Snegireva II. Suggestions for preventing undesired reactions at application immunobiological medicinal products in the Russian Federation. *Bezopasnost' i risk farmakoterapii = Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2015;(1):25–9 (In Russ.)]
- Гриднева НИ. Конструирование и стандартизация сухих диагностических питательных сред промышленного выпуска: дис. ... канд. мед. наук. М.; 1979. [Gridneva NI. Design and standardization of dry diagnostic nutrient media of industrial production. Cand. Med. Sci. [dissertation]. Moscow; 1979 (In Russ.)]
  - Суханова СМ, Захарова НЕ, Конду ЭИ. Оценка качества агара очищенного для бактериологических питательных сред. В кн.: *Материалы Всероссийской научной конференции, посвященной 100-летию со дня основания Томского «НПО» Вирион»: «Актуальные вопросы разработки, производства и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов»*. Томск; 2004. С. 71–3. [Sukhanova SM, Zakharova NE, Condu EI. Evaluation of the quality of purified agar for bacteriological nutrient media. In: *Materials of the All-Russian scientific conference, dedicated to the 100th anniversary of the founding of the Tomsk «NGO» Virion»: «Actual Issues of Development, Production and Application of Immunobiological and Pharmaceutical Preparations»*. Tomsk; 2004. P. 71–3 (In Russ.)]
  - Поляк МС, Сухаревич ВИ, Сухаревич МЭ. *Питательные среды для медицинской микробиологии*. СПб.: ООО «Анатолия»; 2003. [Polyak MS, Suharevich VI, Suharevich ME. *Nutrient Media for Medical Microbiology*. St. Petersburg: ООО «Anatoliya»; 2003 (In Russ.)]
  - Merck Microbiology Manual 12th ed. Darmstadt: Merck KGaA. Available from: <https://ru.scribd.com/doc/94454909/Merck-Microbiology-Manual-12th>
  - ГОСТ Р 51088-2013. Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации. М.: Стандартинформ; 2014. [State Standard P 51088-2013 *In vitro* Diagnostic Medical Devices. Reagents, Kits, Test-Systems, Control Materials, Culture Media, Requirements to Devices, and to Supporting Documentation. Moscow: Standartinform; 2014 (In Russ.)]
  - Национальный стандарт РФ ГОСТ Р ЕН 12322-2010. «Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Питательные среды для микробиологии. Критерии функциональных характеристик питательных сред». М.: Стандартинформ; 2011 [State Standard R EN 12322-2010. *In vitro* Diagnostic Medical Devices. Culture Media for Microbiology. Performance Criteria for Culture Media. Moscow: Standartinform; 2011 (In Russ.)]
  - МУК 4.2.2316-08. *Методы контроля бактериологических питательных сред*. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008. [MUK 4.2.2316-08. *Methods of Control of Bacteriological Nutrient Media*. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2008 (In Russ.)]
  - Общая фармакопейная статья 1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота». Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1, М.; 2015. [General monograph 1.2.4.0002.15 Microbiological purity. The State pharmacopoeia of Russian Federation 13th ed. V. 1. Moscow; 2015 (In Russ.)] Available from: <http://www.femb.ru/feml>
  - Бакулин МК, Лещенко АА, Чеботарев ЕВ. *Микробиология. Методические указания к лабораторным работам и учебной практике (специальность «Микробиология»)*. Киров; 2005. [Bakulin MK, Leschenko AA, Chebotarev EV. *Microbiology. Methodical Instructions to Laboratory Works and Training Practice (specialty «Microbiology»)*. Kirov; 2005 (In Russ.)] Available from: <https://studfiles.net/preview/4350266>
  - МУК 4.1/4.2.588-96. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям. [MUK 4.1/4.2.588-96. *Testing of Injectable Medical Immunobiological Preparations (In Russ.)*]
  - Воробьев АА, ред. *Медицинская микробиология, вирусология и иммунология*. М.: Медицинское информационное агентство; 2012. [Vorobiev AA, ed. *Medical Microbiology, Virology and Immunology*. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2012 (In Russ.)]
  - Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. V. 2. New York; 2009.
  - Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. V. 3. New York; 2009.
  - Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. V. 5. New York; 2012.
  - Мавлянов ИР, Мустафин РИ, Кенжаева ДХ. Характеристика микрофлоры желудка у больных с ревматоидным и реактивными артритами. В кн.: *Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции «Боткинские чтения» 11–12 мая 2017*. СПб.: Человек и его здоровье; 2017. С. 163–4. [Mavlyanov IR, Mustafin RI, Kenzhaeva DKh. Characteristics of Gastric Microflora in Patients with Rheumatoid and Reactive Arthritis. In: *Collection of abstracts of the All-Russian research-to-practice conference «Botkin Readings» 11–12 May, 2017*. St. Petersburg: Chelovek i ego zdorov'e; 2017. P. 163–4 (In Russ.)]
  - Джораева СК, Иванцова ЕК, Кочетова НВ, Васильева ЕС, Щеголева ЕВ, Ковалик АИ. Микробиологический мониторинг состава и антибиотикорезистентности возбудителей оппортунистических инфекций уrogenитального тракта. *Dermatologiya ta venerologiya = Дерматология та венерология*. 2012;(4):34–9. [Dzhoraeva SK, Ivantsova EK, Kochetova NV, Vasilyeva ES, Shchogoleva EV, Kovalic AI. The microbiological content and antibiotic resistance monitoring of the opportunistic infection pathogens in the urogenital tract. *Dermatology and Venereology*. 2012;(4):34–9 (In Russ.)]
  - Tsai CY, Su SH, Cheng YH, Chou YL, Tsai TH, Lieu AS. *Kocuria varians* infection associated with brain abscess: A Case Report. *BMC Infect Dis*. 2010;10:102. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-102>
  - Mousumi Paul, Renu Gupta, Suman Khushwaha, Rajeev Thakur. *Kocuria rosea*: an emerging pathogen in acute bacterial meningitis — Case Report. *JMAA*. 2015;1(1):4–7.

#### Об авторах

**Суханова Светлана Михайловна**, канд. биол. наук, начальник лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6621-4384>

**Захарова Наталия Евгеньевна**, канд. биол. наук, главный эксперт лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-0985-3694>

Поступила 06.12.2017

Принята к публикации 26.04.2018

#### Authors

**Svetlana M. Sukhanova**, Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Bacteriological Culture Media and Cell Cultures of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6621-4384>

**Nataliya E. Zakharova**, Candidate of Biological Sciences, Chief Expert of the Laboratory of Bacteriological Culture Media and Cell Cultures of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-0985-3694>

Received 6 December 2017

Accepted 26 April 2018



## Михаил Константинович Бакулин (к 65-летию со дня рождения)

## Mikhail Konstantinovich Bakulin (on the 65th Anniversary)

8 августа 2018 года исполнилось 65 лет со дня рождения доктора медицинских наук, профессора, ведущего научного сотрудника филиала ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации» (г. Киров) Михаила Константиновича Бакулина.

М.К. Бакулин родился в 1953 г. в семье пограничника в г. Сокольи Львовской области. В 1976 г. окончил Военно-медицинский факультет при Саратовском медицинском институте и был направлен в 48 ЦНИИ Минобороны России (г. Киров) на должность младшего научного сотрудника. В 2009 г. завершил военную службу в должности главного научного сотрудника 48 ЦНИИ Минобороны России, полковника медицинской службы.

В 1994 г. Михаил Константинович защитил диссертацию на соискание ученой степени доктора медицинских наук, в 2000 г. ему присвоено ученое звание профессора. С 1996 по 2018 г. М.К. Бакулин, работая на должности профессора Вятского государственного университета, преподавал биологические дисциплины студентам, бакалаврам, магистрантам.

Основные направления исследований М.К. Бакулина связаны с разработкой иммунобиологических препаратов для профилактики и лечения особо опасных бактериальных инфекций.

На основе полученных им результатов исследований разработаны новые высокоэффективные средства и методы профилактики, диагностики, лечения опасных и особо опасных инфекционных заболеваний, позволя-

ющие значительно снизить санитарные потери личного состава в очаге биологического заражения. Новизна перечисленных разработок подтверждена 27 авторскими свидетельствами на изобретения СССР и патентами на изобретения Российской Федерации.

При непосредственном участии М.К. Бакулина было разработано, аттестовано Национальным органом контроля медицинских иммунобиологических препаратов (ГИСК им. Л.А. Тарасевича) и внедрено в практику 12 препаратов, предназначенных для профилактики, диагностики и лечения особо опасных инфекционных заболеваний.

Михаил Константинович в настоящее время активно занимается подготовкой высококвалифицированных специалистов по специальности «Микробиология». На протяжении 22 лет он является членом диссертационного совета при 48 ЦНИИ Мин-обороны России. Под его руководством защищены 12 диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук. М.К. Бакулин является автором более 280 научных трудов в области микробиологии и иммунологии бактериальных инфекций.

М.К. Бакулин — ветеран боевых действий. За значительный вклад в дело защиты Отечества и особо выдающиеся заслуги перед государством по защите населения и личного состава Вооруженных Сил Михаил Константинович Бакулин награжден орденом «За службу Родине в Вооруженных Силах СССР» III степени и орденом Почета.



## Владимир Александрович Шевцов (к 60-летию со дня рождения)

## Vladimir Aleksandrovich Shevtsov (on the 60th Anniversary)

31 августа 2018 года исполнилось 60 лет со дня рождения кандидата медицинских наук, заслуженного врача Российской Федерации Владимира Александровича Шевцова.

В.А. Шевцов родился в 1958 году в г. Минске в семье служащих. После окончания школы в 1975 г. поступил в Калининский государственный медицинский институт, затем был переведен и в 1981 г. окончил Военно-медицинский факультет при Горьковском государственном медицинском институте по специальности «Лечебно-профилактическое дело».

С 1981 по 1987 г. Владимир Александрович проходил военную службу врачом-специалистом противочумного отряда в Монгольской Народной Республике, с 1987 по 1998 г. — в санитарно-эпидемиологическом отряде Московского военного округа в должностях начальника отделения особо опасных инфекций, затем — отдела особо опасных инфекций Московского военного округа.

В период с 1998 по 2010 г. В.А. Шевцов служил в Главном центре государственного санитарно-эпидемиологического надзора Министерства обороны Российской Федерации последовательно начальником отделения особо опасных инфекций, отдела особо опасных инфекций, лаборатории особо опасных инфекций.

В 2000 г. Владимир Александрович защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук на тему «Эпидемиологические осо-

бенности коревой инфекции в воинских коллективах в период массовой вакцинопрофилактики».

В.А. Шевцов закончил службу в звании полковника медицинской службы. В августе 2010 г. был назначен на должность заведующего лабораторией кишечных вирусных инфекций Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича.

С апреля 2011 г. по настоящее время Владимир Александрович Шевцов работает в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в должности начальника управления экспертизы противовирусных медицинских иммунобиологических препаратов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов.

Владимир Александрович — участник боевых действий. В 1995 и 2008 г. принимал участие в контртеррористической операции на Северном Кавказе, организовывал проведение противоэпидемических мероприятий в местах дислокации воинских контингентов.

В.А. Шевцов — автор 67 печатных работ по вопросам организации противоэпидемических мероприятий и диагностики опасных инфекционных заболеваний. Награжден орденом «За военные заслуги», почетной грамотой Великого государственного Хурала Монголии, знаком «Отличнику здравоохранения». Указом Президента Российской Федерации от 27 января 2010 г. Владимиру Александровичу присвоено почетное звание «Заслуженный врач Российской Федерации».



## Памяти Ирины Григорьевны Осиповой

## In memory of Irina Grigoryevna Osipova

31 июля 2018 года на 60-м году жизни после продолжительной тяжелой болезни скончалась доктор биологических наук, профессор Ирина Григорьевна Осипова.

Замечательный ученый и организатор, энтузиаст, успешный специалист, всю свою долгую и плодотворную профессиональную жизнь она посвятила решению важных и сложных проблем и задач здравоохранения, будучи членом коллектива ГИСК им. Л.А. Тарасевича (1985–2009 гг.), а в дальнейшем — ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (2009–2018 гг.).

За время работы Ирина Григорьевна занимала должности заведующего лабораторией коллекционирования микроорганизмов ГИСК им. Л.А. Тарасевича, заместителя начальника управления экспертизы лекарственных средств № 1 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств, главного научного сотрудника, главного аналитика Центра фармакопей и международного сотрудничества ФГБУ «НЦЭСМП»

Минздрава России. Она являлась членом Фармакопейного комитета Минздрава России по Государственной фармакопее, а также членом Фармакопейного комитета ЕАЭС.

Ирина Григорьевна — соавтор более 150 научных публикаций, в том числе патентов на изобретения, занималась проблемами разработки и экспертизы качества биологических лекарственных средств и диагностических препаратов. Лично Ириной Григорьевной и под ее руководством разработано более 100 проектов ОФС и ФС на биологические лекарственные средства, в том числе включенных в Государственную фармакопею Российской Федерации XIII издания. Профессиональные успехи и достижения Ирины Григорьевны были неоднократно отмечены ведомственными наградами.

Ирина Григорьевна была чутким, внимательным, не равнодушным к чужим проблемам человеком, готовым каждую минуту прийти на помощь.

Светлая память об Ирине Григорьевне Осиповой навсегда сохранится в сердцах родственников, коллег, учеников и друзей.



## Памяти Лидии Григорьевны Карпович

### In memory of Lidiya Grigoryevna Karpovich

20 июля 2018 года после тяжелой продолжительной болезни на 86-м году ушла из жизни доктор медицинских наук, профессор Карпович Лидия Григорьевна.

Ученица и соратница Е.Н. Левкович, она была одним из первых исследователей генетики и эволюции арбовирусов, вирусов герпеса, вирусов полиомиелита, гепатита А. Лидия Григорьевна, помимо академических научных исследований, долгие годы руководила лабораторией энтеро- и аденовирусных инфекций ГИСК им. Л.А. Тарасевича.

Большую часть своей жизни она посвятила здравоохранению, развивая приоритетные научные направления в области вирусологии, иммунологии и вакцинологии, возглавляя направления по научному обеспечению качества и безопасности полиовирусных вакцин, совершенствованию методов стандартизации и контроля энтеро- и аденовирусных диагностических препаратов и живых вакцин с использованием комплекса вирусологических, цитологических, генетических, иммунологических, электронно-микроскопических и молекулярно-биологических методов.

Под руководством Лидии Григорьевны лаборатория занимала передовые научные позиции, принимала участие в международных исследованиях ВОЗ. В лаборатории отработывали и внедряли новые микрометоды контроля активности полиовакцин в перевиваемых клетках Нер-2 Цинциннати, нейровирулентности вак-

цинных штаммов на трансгенных животных и молекулярно-биологические методы (MAPREC).

Л.Г. Карпович руководила исследованиями по разработке методов контроля качества новых иммунобиологических препаратов, участвовала в разработке первой отечественной инактивированной вакцины против гепатита А.

Как руководитель лаборатории в составе Национального органа контроля медицинских иммунобиологических препаратов (ГИСК им. Л.А. Тарасевича) Лидия Григорьевна организовывала предреализационный контроль полиомиелитной вакцины, разработку и внедрение в практику национальных стандартных образцов, необходимых для отечественных предприятий-изготовителей вакцинных и диагностических препаратов.

Лидия Григорьевна — лауреат Премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники. Результаты ее научных работ неоднократно отмечались дипломами и медалями ВДНХ. Под ее руководством в лаборатории были защищены 2 докторские и 1 кандидатская диссертации.

Лидия Григорьевна была принципиальным и честным ученым. Она внесла весомый вклад в развитие вирусологии, молекулярной биологии, иммунологии и вакцинологии.

Светлая память о Лидии Григорьевне Карпович, выдающемся ученом, отзывчивом, прекрасном человеке, научном руководителе и друге, навсегда сохранится в сердцах родственников, коллег, учеников и друзей.



## Памяти Наталии Ивановны Лонской

### In memory of Nataliya Ivanovna Lonskaya

23 июля 2018 года на 78-м году после продолжительной болезни ушла из жизни кандидат медицинских наук Наталия Ивановна Лонская.

Всю свою жизнь Н.И. Лонская посвятила изучению иммунобиологических лекарственных препаратов против гриппа и гриппоподобных инфекций. Успешно окончив Московский медицинский институт им. И.М. Сеченова по специальности «Медико-санитарное дело», Наталия Ивановна начала трудовую деятельность в Институте полиомиелита и вирусных гепатитов им. М.П. Чумакова.

В 1971 году поступила на работу в ГИСК им. Л.А. Тарасевича, где прошла путь от младшего научного сотрудника до заведующей лабораторией гриппа, парагриппа и других ОРЗ. Под ее руководством лаборатория осуществляла надзор за качеством препаратов для профилактики и диагностики гриппа и других респираторных вирусных инфекций, принимала участие в государственных испытаниях отечественных и зарубежных препаратов.

С апреля 2011 по апрель 2016 года Наталия Ивановна работала в должности главного эксперта Управления экспертизы противовирусных МИБП ФГБУ

«Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В течение многих лет Наталия Ивановна была заместителем председателя Межведомственной комиссии по гриппозным вакцинным и диагностическим штаммам при Минздраве России.

Н.И. Лонская — автор и соавтор более 120 опубликованных научных работ. Неоднократно принимала участие в международных конференциях различного уровня в области разработки и внедрения в практику вакцин для профилактики гриппа.

Награждена медалями «Ветеран труда», «В память 850-летия Москвы» и нагрудным знаком «Отличнику здравоохранения».

В коллективе Наталию Ивановну ценили за ее деловые качества и профессионализм, а дома — за заботу и любовь к близким людям.

В памяти родных и близких, друзей, соратников, коллег Наталия Ивановна Лонская останется не только прекрасным специалистом, но и человеком высоких душевных и этических качеств. Светлая память о ней навсегда останется в наших сердцах.



Подписку на журнал  
**«БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение»**  
можно оформить в любом почтовом отделении России.

- Подписной индекс в каталоге Агентства «Роспечать»  
**«Издания органов научно-технической информации» — 57941**
- В региональных агентствах подписки  
**Урал-Пресс (www.ural-press.ru) — 57941**
- По объединенному каталогу  
**«Пресса России» (www.pressa-rf.ru) — Ф57941**

