

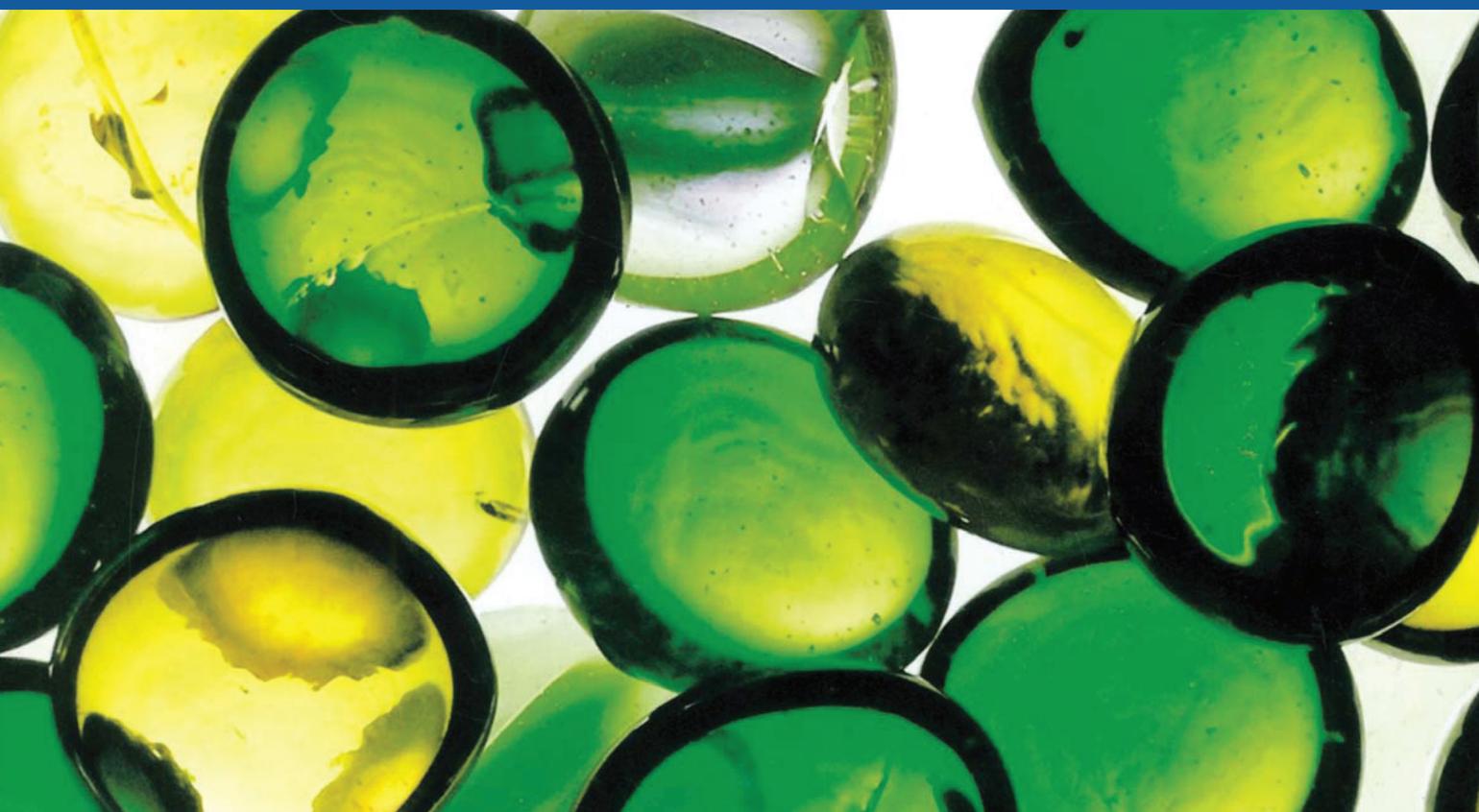
ISSN 2221-996X (Print)
ISSN 2619-1156 (Online)

БИО ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

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

Том 19, № 1
Январь – март 2019



Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment

В НОМЕРЕ

К 100-летию со дня создания в России Государственного контрольного института вакцин и сывороток

Обоснование методических подходов к экспертной оценке подлинности биомедицинских клеточных продуктов

Включен в наукометрическую базу данных Science Index
on-line версия журнала www.biopreparations.ru

Журнал индексируется в базе данных
«Российский индекс научного цитирования» (РИНЦ).
Пятилетний импакт-фактор РИНЦ — 0,471
(без самоцитирования).

Архив журнала размещен в российских
и международных базах научного цитирования —
научной электронной библиотеке eLIBRARY.RU,
Российской государственной библиотеке,
«Российский индекс научного цитирования» (РИНЦ),
«КиберЛенинка», «Соционет», каталогах Национальной
Медицинской Библиотеки США (NLM каталог), Directory
of Open Access Journals (DOAJ), Dimensions, Академии
Google (Google Scholar), Bielefeld Academic Search Engine
(BASE), WorldCat, Open Archives Initiative, Research Bible.

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 19, № 1
Январь — март 2019

BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie
[BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]

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

Volume 19, No. 1
January — March 2019

«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 Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. 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 Oblast, Russia)

Ravil A. Khamitov, Doctor of Medical Sciences, Professor (Volginsky, Vladimir Oblast, 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 Oblast, 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 Oblast, 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, Associate Professor (Moscow, Russia)

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

EDITOR

Alina P. Shestakova (Moscow, Russia)

СОДЕРЖАНИЕ

Редакционная статья

К 100-летию со дня создания в России Государственного контрольного института вакцин и сывороток

О. Ю. Гойкалова, Е. В. Лебединская, А. П. Шестакова 6

Обзоры

Современные проблемы вакцинопрофилактики бешенства

А. А. Мовсесянц, Ю. В. Олефир 10

Регистрация неоригинальных биотерапевтических (биоподобных) препаратов в США

А. А. Солдатов, Ж. И. Авдеева, В. П. Бондарев, В. Д. Мосягин 17

Оригинальные статьи

Обоснование методических подходов к экспертной оценке подлинности биомедицинских клеточных продуктов

Е. В. Мельникова, О. А. Рачинская, Г. А. Трусов, М. Д. Хорольский, И. С. Семенова,
Н. В. Терешкина, В. А. Меркулов 28

Физико-химические и биологические свойства биоподобного и референтного препаратов тканевого активатора плазминогена

В. Д. Гусарова, М. С. Пантюшенко, В. М. Симонов, Р. Р. Шукуров, Р. А. Хамитов, А. Ю. Вишневецкий 39

Оптимизация процесса концентрирования микробных клеток в технологии чумных вакцин

Д. А. Шаров, А. А. Лещенко, С. В. Багин, Д. А. Мохов, С. В. Логвинов, В. В. Крупин,
А. В. Ежов, А. Г. Лазыкин, В. В. Бирюков 50

Особенности стандартизации туберкулиновых препаратов

Н. В. Александрова, Д. Т. Леви, А. В. Наконечная, А. А. Савина 56

Хроника

Сергей Харитонович Дегтярев (к 65-летию со дня рождения) 64

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@expmed.ru

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

Сайт: www.biopreparations.ru

Издатель: ООО «НЭИКОН ИСП»

Юридический адрес: 115114, Москва, ул. Летниковская, д. 4,
стр. 5, офис 2.4

E-mail: isupport@neicon.ru

Тел./факс: +7 (499) 754-99-94

Сайт: https://neicon.ru/

Подписано в печать: 14.02.2019

Формат 60×90/8. Усл. печ. л. 8,25

Бумага мелованная. Печать офсетная

PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Peer-reviewed scientific and practical journal

CONTENTS

Editorial Article

On the 100th Anniversary of the Establishment of the Russian State Institute for Control of Vaccines and Sera

O. Yu. Goykalova, E. V. Lebedinskaya, A. P. Shestakova 6

Reviews

Current Challenges of Preventive Vaccination against Rabies

A. A. Movsesyants, Yu. V. Olefir 10

Authorisation of Non-Innovator Biotherapeutic (Biosimilar) Products in the USA

A. A. Soldatov, Zh. I. Avdeeva, V. P. Bondarev, V. D. Mosyagin 17

Original Articles

Justification of Methodological Approaches to Identification Testing of Biomedical Cell Products

E. V. Melnikova, O. A. Rachinskaya, G. A. Trusov, M. D. Khorolsky, I. S. Semenova,
N. V. Tereshkina, V. A. Merkulov 28

Physico-Chemical and Biological Properties of Biosimilar and Reference Tissue Plasminogen Activator Products

V. D. Gusarova, M. S. Pantyushenko, V. M. Simonov, R. R. Shukurov, R. A. Khamitov, A. Yu. Vishnevskiy 39

Optimisation of the Microbial Cell Concentration Procedure in Plague Vaccine Production

D. A. Sharov, A. A. Leshchenko, S. V. Bagin, D. A. Mokhov, S. V. Logvinov, V. V. Krupin,
A. V. Ezhov, A. G. Lazykin, V. V. Biryukov 50

Specific Aspects of Tuberculin Products Standardisation

N. V. Aleksandrova, D. T. Levi, A. V. Nakonechnaya, A. A. Savina 56

Chronicle

Sergey Kharitonovich Degtyarev (on the 65th Anniversary) 66

Mass media registration certificate:
PI No. FS77-53128 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 Blvd, 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: «NEICON ISP» LLC.

Registered office: 4/5 Letnikovskaya St., Moscow, 115114,
Russian Federation

E-mail: isupport@neicon.ru

Phone/fax: +7 (499) 754-99-94

Website: https://neicon.ru/

Passed for printing: February 14, 2019

Format 60×90/8. Conventional printed sheets: 8.25
Enamel-paper. Offset printing

К 100-летию со дня создания в России Государственного контрольного института вакцин и сывороток



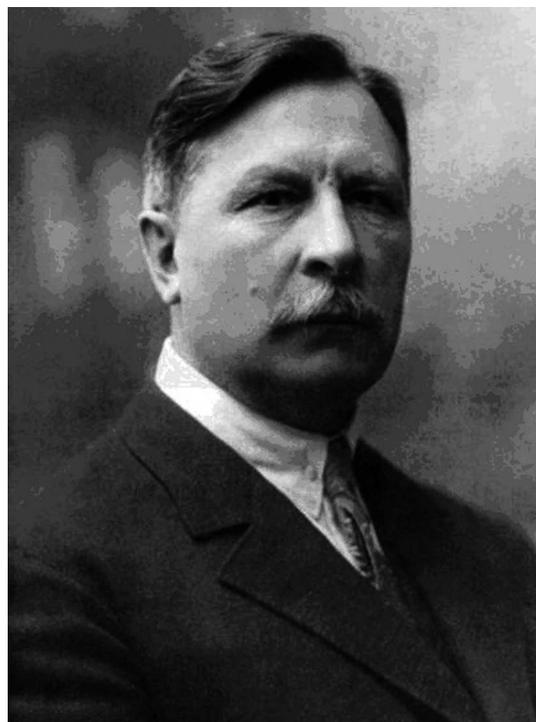
On the 100th Anniversary of the Establishment of the Russian State Institute for Control of Vaccines and Sera

В январе 2019 г. исполнилось 100 лет со дня организации в России Государственного контрольного института вакцин и сывороток, который на тот период входил в состав объединенного Государственного института народного здравоохранения им. Пастера (ГИНЗ). Согласно Уставу¹ ГИНЗ был центральным научным учреждением, которое изучало и разрабатывало научные и научно-практические вопросы в области гигиены, микробиологии, эпидемиологии, химии, экспериментальной биологии и физиологии питания. Решение о создании в России Контрольного института вакцин и сывороток было принято по приказу народного комиссара здравоохранения РСФСР Н. А. Семашко.

Руководителем ГИНЗ и директором института был назначен Лев Александрович Тарасевич — видный микробиолог, основатель первой в России станции по контролю вакцин и сывороток.

На момент создания институт состоял из четырех отделений: контроля сывороток, контроля вакцин, оспенного детрита и отделения изготовления диагностических сывороток. Число сотрудников составляло 21 человек.

Идея о необходимости организации в России такого института принадлежала Степану Васильевичу Коршуну (1868–1931) — директору Харьковского бактериологического института, доктору медицинских наук, профессору. Замысел С. В. Коршуна состоял в том, чтобы изготовление стандартов, контроль сывороток и других лечебных препаратов в России осуществлял особый контрольный институт, который не занимался бы их производством. С. В. Коршун также предложил допускать в Россию только те лечебные сыворотки и бактериологические препараты, которые имели бесспорное лечебное значение и не изготавливались в российских лабораториях, подвергая их контролю наравне с русскими препаратами. Позднее С. В. Коршун тесно взаимодействовал с Л. А. Тарасевичем по вопросам разработки и производства стандартных препаратов лечебных и профилактических сывороток.



Профессор С. В. Коршун — автор идеи создания контрольного института в России

В 1923 г. соответственно расширению задач институт был переименован в Институт экспериментальной терапии и контроля вакцин и сывороток. Институту был поручен контроль



Здание Контрольного института до реконструкции (Москва, 1919)

«За Плотниковым переулком виднеется здание (№ 41) с оригинальным выгнутым навесом над подъездом: три этажа его левой части появились в 1884 г. (архитектор К. И. Андреев), а в 1936–1937 гг. старое здание было встроено в ныне существующее по проекту Н. И. Транквилицкого. До 1917 г. в доме находилась частная мужская гимназия З. И. Шамониной, в 1920-х гг. он был занят медико-биологическими институтами. Последняя перестройка была осуществлена для жилого дома и лабораторий Института госсанинспекции им. Л. А. Тарасевича, известного биолога и организатора здравоохранения, который работал и жил в этом здании. Здесь же работали крупные ученые — биолог Н. К. Кольцов, бывший председателем Русского евгенического общества, помещавшегося здесь, и физиолог М. Н. Шатерников. В доме жил биолог А. С. Серебровский, известный своими работами по генетике. Здесь в 1920-х гг. находился небольшой музей И. И. Мечникова».

Романюк С. К.
Из истории московских переулков

¹ Положение о Государственном научном институте народного здравоохранения им. Пастера. 1919–1924.



Сотрудники отдела контроля живых вакцин и туберкулина (середина 30-х годов XX в.)



Конференция в вакцинном отделе (середина 30-х годов XX в.)

бактерийных препаратов, изготавливаемых на территории всех республик СССР.

В 1925 году в институте впервые в СССР была открыта лаборатория по изучению эффективности противотуберкулезной вакцины, штаммы которой были получены Л. А. Тарасевичем от профессора А. Кальметта, что внесло значимый вклад в процесс иммунизации населения против туберкулеза.

В это же время, осенью 1925 года, при институте был создан Музей живых культур производственных штаммов, а также культур микроорганизмов, выделенных в различных географических зонах СССР. Позднее в институте был организован отдел живых культур, который в различные годы возглавляли ведущие микробиологи страны, доктора и кандидаты наук: Н. Л. Живаго, Е. М. Соловьева, М. М. Маевский, Н. Г. Ключева, Е. Н. Меликова, Е. Д. Равич-Биргер, З. М. Андреева.

Л. А. Тарасевич был одним из учеников и последователей И. И. Мечникова, и именно в память создателя фагоцитарной теории иммунитета при институте был открыт музей памяти И. И. Мечникова. В музее были собраны печатные труды Ильи Ильича на разных языках, книги и статьи о нем, о его работах, записные тетради с 1861 г. и другие документы.

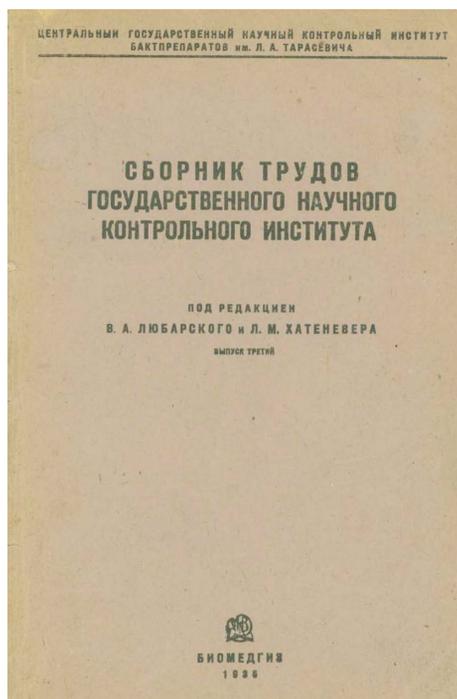
В 1927 г. после смерти Л. А. Тарасевича институт получил его имя.

В 1930 году институты, входившие в ГИНЗ, стали самостоятельными научными учреждениями. В связи с этим Институт экспериментальной терапии и контроля вакцин и сывороток был переименован в Государственный контрольный институт вакцин и сывороток им. Л. А. Тарасевича. В тот период задачи института состояли в контроле бактериальных препаратов и снабжении производственных институтов стандартами сывороток и штаммами патогенных микроорганизмов; разработке методов бактериологического и серологического контроля препаратов; проведении научно-исследовательских работ по изучению иммунитета при вакцинации. В институте активно велась педагогическая работа, которая состояла в организации практических занятий по вопросам иммунитета, отдельным главам частной микробиологии, а также в подготовке аспирантов, организации курсов усовершенствования санитарных врачей.

В начале 1931 г. по распоряжению народного комиссара здравоохранения была создана комиссия, которая оценивала работу института². В акте обследования комиссия констатировала, что существующая система контроля оторвана от производства и не может считаться вполне удовлетворительной. В связи с этим на институт была возложена новая задача —

контроль производства и испытания бактериальных препаратов. В 1934 г. контроль на всех стадиях производства бактериальных препаратов был возложен на организованные для этой цели местные контрольные лаборатории. Таким образом была установлена трехуровневая система контроля бактериальных препаратов: на производстве, в местных контрольных лабораториях и в Государственном контрольном институте вакцин и сывороток им. Л. А. Тарасевича.

В годы Великой Отечественной войны право выпуска каждой серии препарата и выдачи контрольного номера было передано местным контрольным лабораториям. В послевоенное время с началом производства антибиотиков в СССР институт был поручен контроль антибиотиков, а также препаратов против вирусных инфекций. В институте появлялись новые лаборатории — энтеро- и ротавирусных инфекций, противоэнцефалитных препаратов.



Сборник трудов Государственного научного контрольного института (1935 г.)

² Основные моменты в работе института в 1931 г. в кн.: Любарский В. А., Хатенев Л. М., ред. Сборник трудов Государственного научного контрольного института. Вып. 1. М.: Государственное медицинское издательство; 1933.



Библиотека института

В 1958 г. согласно приказу министра здравоохранения СССР³ институт был снова переименован в Государственный контрольный институт медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича, а еще позднее — в Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л. А. Тарасевича (ГИСК им. Л. А. Тарасевича).

В 1960–1970-е годы были организованы новые лаборатории: лаборатория аллергенов, лаборатория физических методов исследования, лаборатория бактериофагов, лаборатория трансфузионных вирусных гепатитов и контаминантов, лаборатория бактериальных вакцин и пробиотиков, лаборатория оценки побочного действия медицинских иммунобиологических препаратов и стандартизации нормативной документации, лаборатория эпидемиологических методов экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, лаборатория иммунологии.

В декабре 1995 г. постановлением Правительства РФ «О государственном контроле за медицинскими иммунобиологическими препаратами» функции национального органа контроля медицинских иммунобиологических препаратов были возложены на ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

Госстандарт России в 1997 г. зарегистрировал самостоятельную систему обязательной сертификации медицинских иммунобиологических препаратов, отличную от системы сертификации других лекарственных средств. Был утвержден особый знак соответствия системы сертификации медицинских иммунобиологических препаратов.

Направления научных исследований института расширялись по мере увеличения решаемых задач. В институте в разные периоды времени работали академики и профессора: О. Г. Анджапаридзе, З. М. Андреева, В. П. Брагинская, Б. Д. Быченко, В. И. Вотяков, Г. В. Выгодчиков, Ю. З. Гендон, Е. В. Глотова, С. Г. Дзагуров, Н. Л. Живаго, П. Ф. Здродовский, А. Т. Кравченко, С. В. Лесняк, В. А. Любарский, И. Ф. Михайлов, Е. Д. Равич-Биргер, Ф. Ф. Резепов, Р. А. Салтыков, В. Д. Соловьев, А. А. Сумароков, А. И. Тогунова, Ф. А. Черткова, Л. Б. Эльберт, Т. Б. Яблокова и другие известные ученые, которые внесли неоценимый вклад в развитие института и совершенствование системы надзора за качеством медицинских иммунобиологических препаратов.

Директорами института после Л. А. Тарасевича в разные периоды были назначены такие известные ученые, как Петр Николаевич Диатропов (1928–1930), Леонид Моисеевич Хатенев (1931–1948), Семен Иванович Диденко (1949–1959),

Лидия Степановна Оглоблина (1959–1962), Иван Федорович Михайлов (1962–1965), Анатолий Тимофеевич Кравченко (1965–1967), Сослан Григорьевич Дзагуров (1967–1984), исполняющий обязанности директора Анна Григорьевна Лузина (1984–1986), Тагир Абдуллаевич Бектимиров (1986–1988), Николай Васильевич Медуницын (1988–2009), Игорь Владимирович Борисевич (2010–2011).

С 2001 г. ГИСК им. Л. А. Тарасевича начал регулярно издавать научно-практический рецензируемый журнал «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение», выпуск которого продолжается и в настоящее время. В журнале публиковались статьи по проблемам разработки и совершенствования биологических лекарственных препаратов, применяющихся в области инфекционной патологии. В настоящее время в журнале освещаются вопросы разработки, стандартизации, контроля качества, производства и применения медицинских биологических препаратов и биомедицинских клеточных продуктов, а также диагностики инфекционных, аллергических и иммунопатологических процессов. В 2010–2011 гг. институтом издан уникальный справочник «Медицинские иммунобиологические препараты» в двух томах (Т. 1: Вакцины; Т. 2: Иммуноглобулины человека, сыворотки и иммуноглобулины гетерологичные, моноклональные антитела, пробиотики, бактериофаги, аллергены, цитокины).

В 2000-х основными направлениями исследований ГИСК им. Л. А. Тарасевича были разработка, унификация и валидация химических, физико-химических и иммунохимических методов контроля качества медицинских иммунобиологических препаратов; совершенствование методов оценки иммуногенности вакцин клещевого энцефалита; разработка методических принципов оценки профилактической, эпидемиологической и экономической эффективности гриппозных вакцин; изучение действия препаратов бактериофагов в отношении возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний и кишечных инфекций; изучение показателей качества препаратов иммуноглобулина человека отечественного и зарубежного производства; разработка стандартных методов оценки биологической активности вакцины туберкулезной (БЦЖ); разработка системы измерения и оценки качества коклюшного компонента в АКДС-вакцине; испытания новых питательных сред и экспертиза научной документации при освоении производства; патоморфологическая оценка безопасности вакцинных штаммов и штаммов пробиотиков и другие.

На всем протяжении своего существования ГИСК им. Л. А. Тарасевича осуществлял контроль не только конечной



Совещание у директора института профессора Л. М. Хатенева

³ Приказ министра здравоохранения СССР М. Ковригина от 29 марта 1958 г.

продукции, но и соблюдение надлежащих условий производства, считая это одним из важнейших требований, гарантирующих высокое качество медицинских иммунобиологических препаратов. В рамках проведения госконтроля и госнадзора институт отвечал за контроль качества вакцин, иммуноглобулинов, бактериофагов, препаратов нормофлоры, аллергенов, цитокинов и других препаратов.

В основных направлениях деятельности институт следовал рекомендациям Всемирной организации здравоохранения. Сотрудники института регулярно принимали участие в международных совместных исследованиях по изучению референс-препаратов, проводимых Всемирной организацией здравоохранения с целью разработки новых международных биологических стандартных образцов, проводили аттестацию отраслевых стандартных образцов медицинских иммунобиологических препаратов, участвовали в работе Комитета Всемирной организации здравоохранения по стандартизации.

В 2011 г. Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича был реорганизован путем при-

соединения к Федеральному государственному бюджетному учреждению «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» (ФГБУ «НЦЭСМП»)⁴. В результате реорганизации была создана государственная структура, предназначенная для осуществления экспертизы качества, эффективности и безопасности всех лекарственных средств, находящихся в обращении на территории Российской Федерации.

В настоящее время государственная задача ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России состоит в содействии обеспечению населения Российской Федерации качественными и эффективными лекарственными средствами, отвечающими требованиям фармацевтической и биологической безопасности, и гарантированном поступлении в российскую систему здравоохранения эффективных, безопасных, качественных лекарственных препаратов как отечественного, так и зарубежного производства.

Благодаря целеустремленности и самоотдаче сотрудников Научного центра экспертизы средств медицинского применения дело, начатое Л. А. Тарасевичем, продолжается и по сей день.

Редакция журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» выражает благодарность сотрудникам Центра планирования и координации НИР, Испытательного центра экспертизы качества МИБП, Управления информатизации ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России за оказанную помощь в подготовке материалов редакционной статьи.

Научные редакторы О. Ю. Гойкалова, Е. В. Лебединская
Редактор А. П. Шестакова

⁴ Борисевич ИВ, Супотницкий МВ, Прощай, ГИСК. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2011;3:6–14.

Современные проблемы вакцинопрофилактики бешенства

А. А. Мовсесянц*, Ю. В. Олефир

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

Актуальность проблемы бешенства для всего человечества, поиск новых путей искоренения инфекции привели к созданию новой глобальной системы для ликвидации бешенства — «Объединенные против бешенства», поставившей перед собой чрезвычайно амбициозную задачу по достижению нулевого уровня смертности людей от гидрофобии во всем мире к 2030 г. С учетом предыдущего многолетнего мирового опыта уничтожения бродячих собак, на долю которых приходится 99 % случаев гидрофобии, что не привело к желаемому результату, в настоящее время взят курс на массовую вакцинацию собак (не менее 70 % популяции животных). Проблема бешенства комплексная, без усилий всех заинтересованных служб, серьезных финансовых затрат вряд ли удастся решить такую глобальную задачу. Материалы данной статьи являются результатом постоянного многолетнего анализа ситуации по бешенству в мире и в Российской Федерации, анализа современного состояния проблемы вакцинопрофилактики бешенства, которая играет огромную, если не ведущую, роль в предупреждении развития гидрофобии у людей, пострадавших от укусов больных бешенством животных. Сформулированы основные направления решения проблемы заболевания бешенством на современном этапе, а именно: массовая вакцинация собак; совершенствование схем и методов применения антирабических препаратов; изучение закономерностей образования иммунного ответа у лиц с ослабленным иммунитетом; постепенное внедрение в практику вакцинации людей, пострадавших от укусов больных бешенством животных, альтернативных методов введения препаратов; разработка экспресс-системы определения титров вируснейтрализующих антител; повышение уровня информированности населения об опасности заболевания.

Ключевые слова: бешенство; пред- и постэкспозиционная вакцинация; антирабическая вакцина; антирабический иммуноглобулин; методы и схемы иммунизации

Для цитирования: Мовсесянц АА, Олефир ЮВ. Современные проблемы вакцинопрофилактики бешенства. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2019;19(1):10–16. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-10-16>

***Контактное лицо:** Мовсесянц Арташес Авакович; Movsesyants@expmed.ru

Current Challenges of Preventive Vaccination against Rabies

А. А. Movsesyants*, Yu. V. Olefir

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

The urgency of the rabies problem for all mankind and the search for new ways of eradicating the disease entailed the creation of a new global initiative for rabies elimination — «United Against Rabies» which sets a highly ambitious goal of achieving zero rabies human deaths by 2030. The many years of international experience in elimination of street dogs, which account for 99 % of rabies cases, did not produce the desired results, therefore the focus was shifted to mass vaccination of dogs (minimum 70 % of dog population). The rabies problem is complex and global, it requires efforts from all the parties involved as well as hefty investment. The paper presents the results of a continuous long-term analysis of the rabies situation in Russia and across the world, as well as analysis of the current state of vaccination against rabies which plays an important, if not crucial, role in prevention of rabies in humans who got bitten by infected animals. The paper formulates the main currently existing ways of solving the rabies problem, namely: mass vaccination of dogs; improvement of dosing schedules and administration routes of medicines against rabies; analysis of immunity development mechanisms in immunocompromised patients; progressive implementation of vaccination of people who got bitten by infected animals, and alternative administration routes; development of an express method of the neutralising antibody titer determination; raising public awareness about disease hazards.

Key words: rabies; pre- and post-exposure vaccination; rabies vaccine; rabies immunoglobulin; immunization methods and schemes

For citation: Movsesyants AA, Olefir YuV. Current challenges of preventive vaccination against rabies. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2019;19(1):10–16. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-10-16>

***Corresponding author:** Artashes A. Movsesyants; Movsesyants@expmed.ru

Когда речь заходит о бешенстве животных и заболевании людей этой опаснейшей инфекцией, невольно возникает вопрос, действительно ли бешенство представляет такую серьезную проблему мирового и отечественного здравоохранения, с которой чрезвычайно трудно бороться, а тем более победить ее. Полностью стереть бешенство с лица земли не удастся никогда из-за огромного числа видов диких животных, каждый из которых может быть резервуаром вируса бешенства, передаваемого домашним животным — собакам и кошкам, сельскохозяйственным животным. Можно с твердой убежденностью признать — пока существует мир дикой природы, будет существовать и бешенство. По данным академика И.А. Бакулова и В.М. Котлярова [1], только перечень видов диких животных насчитывает более 1,5 млн наименований, а сколько особей в популяции каждого вида (потенциальных источников вируса бешенства), вообще невозможно сосчитать.

Сложившаяся в мире очень сложная эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по бешенству не имеет тенденции к снижению, бешенство по-прежнему, по оценке Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ)¹ [2, 3], продолжает занимать одно из ведущих мест среди инфекционных болезней, общих для человека и животных, нанося огромный экономический ущерб. По данным Глобального альянса по контролю бешенства (GARC, 1917), ежегодные расходы, связанные с различными аспектами борьбы против этой инфекции, составляют 8,6 млрд долларов США².

Неблагополучная эпизоотическая ситуация отмечается более чем в 150 странах мира³ [4], в большинстве из них вирус бешенства персистирует в организме наиболее опасных резервуаров инфекции — более чем в 99 % случаев бешенства у людей вирус передается собаками⁴ [5].

Такая ситуация не могла не сказаться на заболеваемости людей, заразившихся вирусом бешенства, — ежегодно погибает 59000 человек, ежедневно в мире от бешенства умирает примерно 160 человек⁵.

Динамика проявлений эпизоотического процесса на территории Российской Федерации [3, 6] свидетельствует о прогрессирующей и пока неконтролируемой эпизоотии природного типа, циклический характер которой зависит от меняющейся численности популяции диких животных — резервуаров и распространителей вируса бешенства. Распространение бешенства среди диких животных, несомненно, способствует вовлечению в эпизоотический процесс и домашних животных — собак и, что особенно тревожно, кошек. Ежегодно в Российской Федерации за медицинской помощью

по поводу укусов обращаются более 400 тысяч человек и более 250 тысяч нуждаются в проведении лечебно-профилактических прививок.

За период 2012–2017 гг. было зарегистрировано 27 случаев смерти от гидрофобии, из которых 86,9 % за медицинской помощью либо не обращались, либо отказались от вакцинации, в 10 % случаев прервали курс антирабического лечения⁶.

Одна из мер борьбы с безнадзорными животными, прежде всего с собаками, — массовое уничтожение безнадзорных собак, которую широко поддерживали ВОЗ и МЭБ (Международное эпизоотологическое бюро). Однако с течением времени стало очевидным, что выбранная стратегия массового уничтожения безнадзорных собак в качестве контроля распространения бешенства оказалась провальной⁷.

Придавая огромную значимость этой проблеме, по случаю Всемирного дня борьбы с бешенством, который отмечается 28 сентября, состоялся запуск крупнейшей глобальной инициативы, не имеющей аналогов по своей амбициозности, по борьбе с бешенством под девизом «Объединенные против бешенства» по достижению 0 (нулевого!) уровня, т.е. полного отсутствия смертности от гидрофобии к 2030 году во всем мире. Партнерами этой глобальной инициативы являются ВОЗ, МЭБ, GARC и FAO⁸.

Основная идея плана, направленного на борьбу с бешенством, состоит в объединении ветеринарных, медицинских и образовательных услуг в сфере профилактики и контроля над бешенством путем использования наилучших мировых практик в борьбе против этой чрезвычайно опасной инфекции. Провальный многолетний опыт массового уничтожения безнадзорных животных⁹, в первую очередь собак, определил 2 ключевых момента для достижения поставленной цели. Во-первых, перекрыть основной источник заражения людей путем расширенной программы вакцинации собак, обеспечивающей иммунизацию не менее 70 % животных данного региона в течение нескольких лет [5]. По данным ВОЗ, массовая вакцинация животных в сочетании с программами по контролю рождаемости является единственным эффективным методом, контролирующим распространение бешенства собак. Во-вторых, важный момент предотвращения смертности людей от бешенства — это, безусловно, своевременная, незамедлительная профилактика и реагирование на каждый случай укусов больным или подозрительным на бешенство животным.

Принцип специфической профилактики бешенства, разработанный Л. Пастером, впервые применившим его для спасения укушенного больной бешенством собакой Джозефа

¹ Агро XXI. Мир без бешенства. <https://www.agroxxi.ru/zhivotnovodstvo/veterinarija/mir-bez-beshenstva.html>

Бешенство. Информационный бюллетень. ВОЗ; 2018. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/rabies>
Rabies vaccines: WHO position paper — April 2018. *Wkly Epidemiol Rec.* 2018;93(16):201–20.

² Комитет экспертов ВОЗ по бешенству: пятый доклад. Серия технических докладов; 321. ВОЗ; 1967.

³ Мовсесянц А.А. Современные проблемы лечения гидрофобии антирабическими препаратами: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М.; 1993.
WHO Guide for Rabies Pre and Post Exposure Prophylaxis in Humans. Updated 2014. https://www.who.int/rabies/PEP_Prophylaxis_guideline_15_12_2014.pdf

⁴ Global Alliance for Rabies Control. 160 People die of rabies every day, says major new study; 2015.

<https://rabiesalliance.org/news/160-people-die-rabies-every-day-says-major-new-study>

WHO Expert Consultation on Rabies. Third report. WHO Technical Report Series No. 1012. WHO; 2018.

<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272364/9789241210218-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

WHO Expert Consultation on Rabies. First report. WHO Technical Report Series No. 931. WHO; 2005.

⁵ Комитет экспертов ВОЗ по бешенству: пятый доклад. Серия технических докладов; 321. ВОЗ; 1967.

⁶ Rabies. Epidemiology and burden of disease. <http://www.who.int/rabies/epidemiology/en>

⁷ Антирабические вакцины. Документ по позиции ВОЗ. Еженедельный эпидемиологический бюллетень. 2007;82(49/50):425–36.

WHO Expert Committee on Rabies. Eighth Report. WHO Technical Report Series No. 824. WHO; 1992.

⁸ Антирабические вакцины. Документ по позиции ВОЗ. Еженедельный эпидемиологический бюллетень. 2007;82(49/50):425–36. Пресс-релиз Санофи Пастер; 2009.

⁹ Антирабические вакцины. Документ по позиции ВОЗ. Еженедельный эпидемиологический бюллетень. 2007;82(49/50):425–36.

Борьба с бешенством в XXI веке. <http://sohmet.ru/news/item/f00/s11/n0001132/index.shtml>

Мейстера в 1885 г., является основой современных методов профилактики и предупреждения развития этой абсолютно смертельной инфекции. Единственным средством защиты людей от гидрофобии является своевременная вакцинация лиц, инфицированных вирусом бешенства, современными антирабическими препаратами, позволившими резко сократить летальность от этого грозного заболевания, хотя клинически проявившаяся гидрофобия всегда заканчивается трагически¹⁰ [8–10].

К сожалению, даже в случаях своевременного и правильно проводимого или проведенного курса лечения регистрируются случаи смерти людей в процессе и после полного курса специфического лечения¹¹. Вакцинация против бешенства, в отличие от известных способов профилактики других инфекционных заболеваний, начинается после того, как люди подверглись укусу больного бешенством или подозрительным на бешенство животного, т.е. по существу уже в начале инкубационного периода. Эта особенность вакцинации позволяет рассматривать прививки против бешенства как раннее лечение гидрофобии¹² вместо привычных «специфическая профилактика», «экстренная профилактика гидрофобии», «лечебная иммунизация» и т.д.¹³

Со времен Пастера антирабические вакцины непрерывно совершенствовались в направлении в первую очередь повышения их эффективности, технологии производства, изменялись методы вакцинации, их интенсификация, схемы применения препаратов и т.д. Создание новых типов вакцин, совершенствование имеющихся, отвечающих высоким требованиям к иммуногенной активности и обладающих слабой (низкой) реактогенностью, требуют экспериментального обоснования схем вакцинации, зависимости схемы вакцинации от типа и иммуногенной активности используемых препаратов. В подавляющем большинстве стран современные антирабические вакцины (культуральные концентрированные очищенные) применяются по схеме, рекомендованной ВОЗ. В настоящее время достаточно обоснованные данные отсутствуют, однако в ряде стран одна и та же вакцина может применяться по четырех-, пятикратной схеме [11], в других странах — шестикратной схеме (Россия), могут меняться и дозировки препарата.

Несмотря на совершенствование системы оказания антирабической помощи и улучшение качества вакцин, проявление бешенства у людей не является еще редкостью и регистрируется во многих странах мира. Возможными причинами, приводящими к развитию клинической картины бешенства и смерти укушенных бешеными животными людей, являются:

- нежелание (или незнание необходимости) подвергнуться профилактическому лечению вакциной;

- позднее обращение (а следовательно, и позднее начало лечения), особенно при локализации укусов на лице, пальцах рук, кистей;

- самовольное прекращение лечения;

- неправильное назначение курса вакцинации, особенно комбинированного;

- несоблюдение требований Инструкции по применению антирабических препаратов.

Неудовлетворительная информированность населения о чрезвычайной опасности этой абсолютно смертельной инфекции, недооценка или незнание пострадавшими характера и исхода этой болезни, важности проведения своевременной и в полном объеме вакцинации зачастую могут явиться причиной трагического исхода. В том числе — и нередко встречающиеся врачебные ошибки при назначении и проведении курса специфического лечения. В более чем 20 % анализируемых нами случаев выявлены различные нарушения в оказании антирабической помощи: нарушались требования Инструкции по применению антирабических препаратов, по вине медицинских работников лечение не назначалось, не учитывались показания к назначению и проведению курса специфического лечения, отказы от прививок и пр. Важную роль играет и отсутствие регулярной системы подготовки врачей-травматологов по оказанию антирабической помощи пострадавшим от укусов животных.

Опасность бешенства для людей и абсолютная летальность в случае развития клинической картины придает исключительную важность проблеме профилактики инфекции, предупреждения развития гидрофобии. Существующая во всем мире единая тактика предупреждения развития инфекции, согласно рекомендациям ВОЗ, после контакта с возбудителем инфекции предполагает немедленную местную обработку раны. Комитет экспертов ВОЗ¹⁴ [12] подчеркивает особую важность местной обработки ран, следов укусов, царапин, которые могут быть инфицированы вирусом бешенства. Она включает в себя использование химических или физических методов, обильное промывание раны мыльным раствором или любым детергентом в течение 10–15 мин, а в случае их отсутствия промывание раны под струей воды в течение 15 мин с последующей обработкой дезинфицирующими средствами: 40–70 % этиловым спиртом, 5 % спиртовым или водным раствором йода, слабым раствором перекиси водорода. Местная обработка раны предполагает вымывание с раневой поверхности до 60–70 % вируса бешенства, что, в свою очередь, уменьшает вероятность скорого попадания вируса в ЦНС. Местная обработка раны ни в коем случае не исключает дальнейшего курса лечения специфическими антирабическими препаратами. К сожалению, этой важной процедуре не придается должного значения: население

¹⁰ Комитет экспертов ВОЗ по бешенству: пятый доклад. Серия технических докладов; 321. ВОЗ; 1967.

Пресс-релиз Санофи Пастер; 2009.

О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2017 году: государственный доклад. 2018. http://rospotrebнадзор.ru/upload/iblock/d9d/gd_2017_seb.pdf

WHO Expert Consultation on Rabies. Third report. WHO Technical Report Series. No. 1012. WHO; 2018.

<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272364/9789241210218-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

¹¹ WHO Expert Committee on Rabies. Eighth Report. WHO Technical Report Series No. 824. WHO; 1992.

Rabies vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec.* 2010;85(32):309–20.

¹² Rabies vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec.* 2010;85(32):309–20.

¹³ WHO Expert Consultation on Rabies. Third report. WHO Technical Report Series. No. 1012. WHO; 2018. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272364/9789241210218-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Rabies vaccines: WHO position paper — April 2018. *Wkly Epidemiol Rec.* 2018;93(16):201–20.

¹⁴ WHO Guide for Rabies Pre and Post Exposure Prophylaxis in Humans. Updated 2014.

https://www.who.int/rabies/PEP_Prophylaxis_guideline_15_12_2014.pdf

WHO Expert Consultation on Rabies. Third report. WHO Technical Report Series No. 1012. WHO; 2018.

<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272364/9789241210218-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

WHO Expert Consultation on Rabies. First report. WHO Technical Report Series No. 931. WHO; 2005.

плохо об этом информировано, отдельные медицинские работники при обращении пострадавших местной обработкой раны пренебрегают. С процедурой местной обработки ран должен быть ознакомлен каждый человек, особенно проживающий в местности, неблагополучной по бешенству, в порядке первой помощи она должна проводиться самим пострадавшим. Этого можно добиться постоянной и качественной санитарно-просветительской работой.

При множественных обширных укусах нередко возникают проблемы, связанные с хирургической обработкой раны (не путать с местной обработкой раны). Одна из рекомендаций ВОЗ — воздержание (там, где это возможно) от наложения швов на раны. Предполагается, что каждый шов — это новые входные ворота для вируса бешенства, который находится в раневой поверхности, способствующие в большей степени его дальнейшему распространению в организме пострадавшего. В исключительных случаях, в соответствии с Инструкцией по применению антирабических препаратов, швы накладываются при обширных ранах, по косметическим показаниям и в случаях повреждений крупных сильно кровоточащих сосудов.

Хорошо известно, что эффективность проводимого специфического лечения находится в прямой зависимости от времени начала лечения после укуса (в течение 24 ч): чем раньше начата лечебно-профилактическая иммунизация, тем больше шансов на формирование достаточно напряженного поствакцинального иммунитета. Другим важным фактором является использование безопасных и эффективных антирабических препаратов. Применять для вакцинации против бешенства возможно только вакцины, зарегистрированные в Российской Федерации и разрешенные к применению Минздравом России. Таким препаратом является вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная. Вакцинация проводится по схеме 0–3–7–14–30 и 90 дней, доза вакцины независимо от возраста 1,0 мл. В Российской Федерации зарегистрирована и разрешена к применению по такой же схеме в той же дозе вакцина антирабическая культуральная очищенная инактивированная Рабипур®, производимая в Германии и Индии по одной и той же технологии. Имеющиеся незначительные различия в характеристиках вакцин не влияют на их основные качества. Обе вакцины за более чем 30-летний период применения характеризуются хорошей переносимостью, безопасностью и эффективностью, в редких случаях могут регистрироваться только местные реакции, неврологические осложнения не отмечались.

Наряду с традиционным внутримышечным применением культуральных концентрированных антирабических вакцин ВОЗ считает возможным применение внутрикожного метода введения вакцины с уменьшенными дозами препарата. Однако такой метод должен иметь доказательство безопасности и эффективности при постэкспозиционной профилактике.

Проблема заключается в невозможности проведения рандомизированных контролируемых испытаний с участием групп сравнения, в которых не применяется вакцина, и фактически об эффективности внутрикожного метода применения антирабических вакцин можно судить только на основании практического опыта. Несмотря на успешное применение в ряде стран (Индия, Филиппины, Таиланд)¹⁵ [3, 11] внутрикожного введения вакцин, доказательная база преимуществ этого метода перед внутримышечным пока недостаточна для более широкого его внедрения. Иммуногенность и безопасность вакцины, которая может предполагать внутрикожный метод введения, должна быть подтверждена клиническими исследованиями всех рекомендованных ВОЗ схем применения, тем более что такие схемы разнообразны, а их толкование неоднозначно. Например, схема внутрикожной постэкспозиционной вакцинации предполагает введение препарата в 8 различных точек тела по 0,1 мл, при этом одну дозу на 90 день можно заменить на 2 внутрикожные инъекции на 30 (!) день. К сожалению, нам не удалось найти в доступной литературе обоснования такой схемы применения вакцины. Кроме того, внутрикожное введение препарата технически более затруднительно, требует специальной подготовки и квалификации персонала, касающейся правильного хранения, разведения и введения препарата для успешной иммунизации.

При укусах опасной локализации (голова, лицо, шея, кисти рук), относящихся к III категории повреждений в соответствии с рекомендациями ВОЗ¹⁶ [2], проводится комбинированный курс вакцинации — антирабический иммуноглобулин + вакцина. В нашей стране производится только гетерологичный (из сыворотки крови лошади) антирабический иммуноглобулин (АИГ) и зарегистрированы иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови человека (Китай), и Ребинолин® (Израиль). По мнению Комитета экспертов ВОЗ¹⁷ [2], комбинированное введение иммуноглобулина и вакцины является оптимальным методом системной антирабической постэкспозиционной вакцинопрофилактики бешенства.

Более серьезные отличия имеются у гетерологичного и гомологичного иммуноглобулинов. Основная проблема — это необходимость, в связи с высоким риском сенсибилизации, проведения кожных проб на индивидуальную чувствительность к чужеродному белку при применении гетерологичного препарата с разведенным 1:100 иммуноглобулином в дозе 0,1 мл (проба по Безредко), что, в свою очередь, может явиться противопоказанием для применения гетерологичного иммуноглобулина. Эта негативная сторона отсутствует при применении гомологичного препарата. Предпочтительно и применение гомологичного иммуноглобулина, который может применяться не позднее 7 сут после укуса в дозе 20 МЕ на 1 кг массы тела, что увеличивает вероятность выработки надежного активного иммунитета, в то время как гетерологичный иммуноглобулин

¹⁵ Борьба с бешенством в XXI веке. <http://sohmet.ru/news/item/f00/s11/n0001132/index.shtml>

Лига помощи животным. Интересная статья про бешенство. <http://ligapethelp.org/forum/viewtopic.php?f=57&t=11669&p=76823&hilit=%D1%81%D1%82%D0%B0%D1%82%D1%8C%D1%8F+%D0%BF%D1%80%D0%BE+%D0%B1%D0%B5%D1%88%D0%B5%D0%BD%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%BE#p76823>

Rabies vaccines: WHO position paper — April 2018. *Wkly Epidemiol Rec.* 2018;93(16):201–20.

¹⁶ WHO Guide for Rabies Pre and Post Exposure Prophylaxis in Humans. Updated 2014.

https://www.who.int/rabies/PEP_Prophylaxis_guideline_15_12_2014.pdf

WHO Expert Consultation on Rabies. Third report. WHO Technical Report Series No. 1012. WHO; 2018.

<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272364/9789241210218-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

WHO Expert Consultation on Rabies. Second report. WHO Technical Report Series No. 982. WHO; 2013.

¹⁷ WHO Expert Consultation on Rabies. Third report. WHO Technical Report Series No. 1012. WHO; 2018.

<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272364/9789241210218-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

WHO Expert Committee on Rabies. Eighth Report. WHO Technical Report Series No. 824. WHO; 1992.

Rabies vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec.* 2010;85(32):309–20.

должен вводиться не позднее 3 сут после укуса в дозе 40 МЕ на 1 кг массы тела.

В ходе проведения комбинированного курса лечения часто у специалистов, проводящих иммунизацию, возникает вопрос последовательности введения препаратов, хотя в инструкции по применению антирабических препаратов есть четкое указание о том, что сначала вводится АИГ и через 30 мин вводится вакцина, а не наоборот. Помимо того, что АИГ способствует созданию у пострадавшего так называемого пассивного иммунитета до начала выработки активного иммунитета после введения вакцины, гетерологичный иммуноглобулин обладает негативным эффектом — блокирующим, интерферирующим действием на выработку активного иммунитета¹⁸. Этим и обусловлена последовательность введения препаратов. Мы неоднократно наблюдали в случаях нарушения последовательности введения препарата эффект подавления выработки вируснейтрализующих антител — надежного показателя иммунитета, индуцируемого вакциной. Учитывая высокий риск сенсибилизации при применении гетерологичного иммуноглобулина, повторное введение АИГ, даже при имеющихся показаниях, не проводится. Применение лошадиного иммуноглобулина всегда чревато возможностью развития аллергических реакций вплоть до анафилактического шока, в связи с чем введение данного препарата, особенно детям, желательно проводить в условиях стационара, где имеется все необходимое для купирования этих нежелательных реакций.

Многолетний анализ случаев смерти людей от гидрофобии в процессе или после полного курса специфического лечения в поисках возможных причин неудачного лечения позволил нам определить позиции ВОЗ и Российской Федерации по проблеме оказания антирабической помощи населению, особенно в части применения антирабических препаратов¹⁹ [7, 9]. С удовлетворением можно отметить, что существующая в России практика применения антирабических препаратов в целом соответствует рекомендациям ВОЗ — местная обработка раны и, в зависимости от категории и тяжести укуса, курс вакцинации либо только вакциной, либо только комбинированный курс антирабическим иммуноглобулином и вакциной. Практически полное сходство позиции России и ВОЗ в соблюдении правил применения антирабических препаратов, а именно: при возможности наблюдения за животными (когда это возможно) в течение 10 дней с одновременным введением вакцины. В случае же если животное погибло, исчезло, лечение продолжают. Таким образом, соблюдено правило незамедлительного начала лечения. Принцип незамедлительности начала вакцинации чрезвычайно важен: своевременная выработка иммунитета позволит спасти жизнь пострадавшего от укуса любым видом животного. Незамедлительная лечебно-профилактическая вакцинация в сочетании с правильной местной обработкой раны, с соблюдением показаний к хирургической обработке раны, введении антирабического иммуноглобулина практически неизменно эффективно в деле профилактики бешенства, даже если заражение заключало в себе высокую степень риска.

Промедления в проведении правильной лечебно-профилактической иммунизации, незавершение ее могут иметь фатальные последствия, особенно в случае укусов в области активной иннервации или в случаях множественных укусов.

Расширение международных туристических связей выставило еще одну проблему — какова должна быть тактика врача-травматолога, хирурга при обращении к нему пострадавшего, которому за рубежом начали вакцинацию препаратом, не зарегистрированным в Российской Федерации? И практика России, и рекомендации ВОЗ предусматривают в исключительных случаях возможность дальнейшего применения с целью завершения курса лечебно-профилактической иммунизации концентрированной вакцины другого типа²⁰.

Серьезной проблемой является полноценный охват предэкспозиционной вакцинацией лиц, которые в силу своей профессиональной деятельности подвергаются повышенному риску инфицирования вирусом бешенства. К этой категории относятся сотрудники лабораторий, ветеринары, животноводы, таксидермисты, лесники и пр., которые могут контактировать с возможно инфицированными дикими, домашними и сельскохозяйственными животными. Высокому риску инфицирования подвергаются дети, проживающие в энзоотических по бешенству регионах, а также путешественники, посещающие опасные регионы.

Схема профилактической вакцинации (на 0–7 и 28 день), принятая в России, отличается от рекомендованной ВОЗ только сроками проведения ревакцинации: в России 1 ревакцинация через 1 год по 1,0 мл 1 инъекция и последующие ревакцинации — каждые 3 года, схема ВОЗ — последующие ревакцинации — каждые 5 лет. Колебания в несколько дней при проведении профилактической вакцинации не имеют принципиального значения. Очень важна рекомендация ВОЗ об обследовании лиц группы риска на наличие вируснейтрализующих антител (ВНА), что предпочтительнее периодических бустерных доз. Бустерная инъекция рекомендуется лишь в тех случаях, если титр ВНА снижается до уровня < 0,5 МЕ/мл. К сожалению, следовать этой рекомендации ВОЗ в России пока не представляется возможным. Единственный путь — усиление информированности групп риска об опасности этой грозной инфекции. Показаний для применения АИГ при профилактической иммунизации не имеется.

Помимо рекомендаций по проведению профилактической вакцинации групп риска, ВОЗ выделяет и проблему вакцинации особых контингентов, тактика проведения которых вызывает много вопросов у практикующих специалистов. К сожалению, одна из частых врачебных ошибок — когда при всех показаниях к лечебно-профилактической иммунизации беременность и кормление грудью рассматриваются как противопоказание к применению антирабических препаратов. Всегда необходимо помнить, что бешенство — единственная инфекция с учетом абсолютной летальности, которая не имеет никаких противопоказаний к введению специфических антирабических препаратов.

Особо важна тактика вакцинации лиц с ослабленным иммунитетом, включая лиц с ВИЧ/СПИДом, имевших контакт категории II или III с больным или подозрительным на бешенство животным. Принятая в России и рекомендованная ВОЗ тактика должна включать тщательную местную обработку раны, проведение полного (6 инъекций) курса вакцинации во всех случаях, даже если конкретное лицо ранее было иммунизировано²¹ [3, 11]. Желательно, по возможности, в течение 2–4 недель после

¹⁸ Борьба с бешенством в XXI веке. <http://sohmet.ru/news/item/f00/s11/n0001132/index.shtml>

Rabies vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec.* 2010;85(32):309–20.

WHO Expert Consultation on Rabies. Second report. WHO Technical Report Series No. 982. WHO; 2013.

¹⁹ WHO Expert Consultation on Rabies. First report. WHO Technical Report Series No. 931. WHO; 2005.

²⁰ WHO Expert Consultation on Rabies. First report. WHO Technical Report Series No. 931. WHO; 2005.

WHO Expert Consultation on Rabies. Second report. WHO Technical Report Series No. 982. WHO; 2013.

²¹ WHO Expert Consultation on Rabies. Second report. WHO Technical Report Series No. 982. WHO; 2013.

окончания вакцинации определить иммунную реакцию выработки антител, нейтрализующих вирус бешенства, с тем чтобы выявить, есть ли необходимость в дополнительной дозе вакцины. Каждый случай необходимости проведения вакцинации лицам с иммунодефицитами должен рассматриваться индивидуально²² [9].

Выводы

Бешенство по-прежнему представляет серьезную проблему общественного здравоохранения для многих стран мира, несмотря на отдельные достижения последних десятилетий в области создания новых антирабических препаратов, пре- и постэкспозиционной профилактики и т.д. Решение одних проблем тут же влечет за собой новые.

Обеспечение выполнения новой глобальной инициативы «Объединенные против бешенства» по достижению 0 (нулевого) уровня, т.е. полного отсутствия смертности людей от гидрофобии к 2030 г. во всем мире, может быть достигнуто только обширным комплексом мер:

1. Массовой вакцинацией собак в сочетании с программой по контролю рождаемости и уничтожения бродячих животных. Минимальный уровень вакцинации собак (домашних и бродячих), проживающих на данной территории, должен составлять 70 %, желаемый уровень вакцинации — 80 % и более [3].

2. Эффективность экстренной вакцинопрофилактики требует проведения дальнейших исследований в направлении совершенствования схем и методов применения антирабических препаратов, получения достоверных данных об эффективности внутрикожного применения вакцины в уменьшенных дозах, особенно в сочетании с антирабическим иммуноглобулином, оптимальных схем и доз вакцинации при повторных укусах для того, чтобы иметь уверенность в состоянии, длительности и напряженности иммунитета у вакцинируемого.

3. Необходимо целенаправленное изучение закономерностей образования иммунного ответа у лиц с ослабленным иммунитетом.

4. Постепенное внедрение в практику вакцинации людей, пострадавших от укусов больных бешенством животных, альтернативных методов введения препаратов — внутрикожного, внутрикожного в сочетании с расчетной дозой АИГ, внутрикожного введения вакцины и разведенного АИГ, обоснование эффективности уменьшенных дозировок антирабических препаратов и т.д.

5. Крайне актуальна разработка экспресс-системы определения титров вируснейтрализующих антител, от уровня выработки которых, информации об этом уровне очень зависит вывод об эффективности проводимой вакцинации.

6. Особое внимание должно быть уделено активной санитарно-просветительской работе, повышению уровня информированности населения об опасности бешенства.

Мы не претендуем на полноту освещения проблемы эффективности антирабической вакцинации, полноту выводов нашей работы и т.д., но без учета всех факторов, влияющих на эффективность вакцинации, вряд ли программа «Объединенные против бешенства» может быть выполнена к указанному 2030 г.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 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. 056-00154-19-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (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. Бакулов ИА, Котляров ВМ. Мировая эпизоотическая ситуация по болезням диких животных. В кн.: *Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей: Материалы международной научно-практической конференции*. Покров, 16–18 апреля 2002, г. Покров; 2002. С. 5–9. [Bakulov IA, Kotlyarov VM. World epizootic situation on diseases of wild animals. In: *Biological and environmental problems of infectious diseases of wild animals and their role in the pathology of farm animals and people: Materials of the international scientific conference*. Pокrov, April 16–18, 2002. Pокrov; 2002. P. 5–9 (In Russ.)]
2. Tordo N, Bahloul C, Jacob Y, Jallet C, Perrin P, Badrane H. Rabies: epidemiological tendencies and control tools. *Dev Biol (Basel)*. 2006;125:3–13.
3. Селимов МА. *Бешенство*. М.: Медицина; 1978. [Selimov MA. *Rabies*. М.: Meditsina; 1978 (In Russ.)]
4. Ambrozaitis A, Laiškonis A, Balčiūniene L, Banzhoff A, Malerczyk C. Rabies post-exposure prophylaxis vaccination with purified chick embryo cell vaccine (PCECV) and purified vero cell rabies vaccine (PVRV) in a four-site intradermal schedule (4-0-2-0-1-1): An immunogenic, cost-effective and practical regimen. *Vaccine*. 2006;24(19):4116–21. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.02.036>
5. Kopel E, Oren G, Sidi Y, David D. Inadequate antibody response to rabies vaccine in immunocompromised patient. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(9):1493–5. <https://doi.org/10.3201/eid1809.111833>
6. Movsesyants AA, Vedernikov VA. Rabies cases per country and administrative units, 4th quarter 2011 in Russian Federation. *WHO Rabies Bulletin Europe*. 2012;35(4).
7. Elmore SA, Chipman RB, Slate D, Huyvaert KP, VerCauteren KC, Gilbert AT. Management and modeling approaches for controlling raccoon rabies: The road to elimination. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(3):e0005249. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005249>
8. Мовсесянц АА, Бектимиров ТА. Гидрофобия у людей, леченных специфическими иммунопрепаратами. *Ветеринарная патология*. 2002;(1):40. [Movsesyants AA, Bektimirov TA. Hydrophobia in humans treated with specific immune drugs. *Veterinarnaya patologiya = Veterinary Pathology*. 2002;(1):40 (In Russ.)]
9. Brown D, Featherstone JJ, Fooks AR, Gettner S, Lloyd E, Schweiger M. Intradermal pre-exposure rabies vaccine elicits long lasting immunity. *Vaccine*. 2008;26(31):3909–12. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.04.081>

²² WHO Expert Consultation on Rabies. First report. WHO Technical Report Series No. 931. WHO; 2005.
WHO Expert Consultation on Rabies. Second report. WHO Technical Report Series No. 982. WHO; 2013.

10. Jackson AC, Warrell MJ, Rupprecht CE, Ertl HC, Dietzschold B, O'Reilly M, et al. Management of rabies in humans. *Clin Infect Dis*. 2003;36(1):60–3. <https://doi.org/10.1086/344905>
11. Мовсесянц АА, Кравченко АТ. Профилактика и лечение бешенства: достижения и проблемы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1989;(8):97–104. [Movsesyants AA, Kravchenko AT. Prevention and treatment of rabies: achievements and challenges. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1989;(8):97–104 (In Russ.)]
12. Rupprecht CE, Briggs D, Brown CM, Franka R, Katz SL, Kerr HD, et al. Evidence for a 4-dose vaccine schedule for human rabies post-exposure prophylaxis in previously non-vaccinated individuals. *Vaccine*. 2009;27(51):7141–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.029>

Об авторах

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>

Олефир Юрий Витальевич, д-р мед. наук, старший научный сотрудник, генеральный директор ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России,
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7652-4642>

Поступила 27.08.2018
После доработки 28.01.2019
Принята к публикации 14.02.2019

Authors

Artashes A. Movsesyants, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

Yuri V. Olefir, Doctor of Medical Sciences, Senior Research Associate, General Director of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7652-4642>

Received 27 August 2018
Revised 28 January 2019
Accepted 14 February 2019

Регистрация неоригинальных биотерапевтических (биоподобных) препаратов в США

А. А. Солдатов*, Ж. И. Авдеева, В. П. Бондарев, В. Д. Мосягин

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

Подготовка научных принципов разработки неоригинальных биотерапевтических (биоподобных, биоаналоговых) препаратов была начата в Европе в начале 2000-х гг., в 2009 г. они были утверждены на международной конференции ВОЗ в Сеуле с участием стран с развитой фарминдустрией. В США закон о биоподобных препаратах принят в 2012 г., за основу были взяты документы и рекомендации, подготовленные ЕМА и одобренные ВОЗ. В 2015 г. FDA опубликовало очередную редакцию основных документов, касающихся биоподобных препаратов. В основе нормативных требований США по разработке и регистрации биоподобных препаратов лежит пошаговая сравнительная оценка биоподобного и оригинального препаратов по атрибутам качества, эффективности и безопасности в соответствии с рекомендациями ВОЗ/ЕМА. При этом по таким вопросам, как дизайн сравнительных исследований качества (физико-химических и биологических свойств), присвоение Международного непатентованного наименования и взаимозаменяемость биоподобных препаратов, нормативные требования США отличаются от национальных рекомендаций других стран, в том числе ЕМА (ВОЗ).

Ключевые слова: биоподобные препараты; биоаналоговые препараты; биосимиляры; экстраполяция; взаимозаменяемость; регистрация биоподобных препаратов

Для цитирования: Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Бондарев ВП, Мосягин ВД. Регистрация неоригинальных биотерапевтических (биоподобных) препаратов в США. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(1):17–27. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-17-27>

Контактное лицо: Солдатов Александр Алексеевич; Soldatov@expmed.ru

Authorisation of Non-Innovator Biotherapeutic (Biosimilar) Products in the USA

A. A. Soldatov*, Zh. I. Avdeeva, V. P. Bondarev, V. D. Mosyagin

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

European competent authorities began to elaborate scientific principles of development of non-innovator biotherapeutic (biosimilar) products in the early noughties, and in 2009 these principles were approved at the WHO International Conference in Seoul gathering participants from countries with a well-developed pharmaceutical industry. The USA adopted the law on biosimilar products in 2012, it was based on the documents and recommendations prepared by the EMA and approved by the WHO. In 2015, the FDA published the new revised versions of the guidelines dealing with biosimilar products. The US regulatory requirements for development and authorisation of biosimilar products are based on a step-by-step comparative assessment of biosimilar and innovator products in terms of their quality, efficacy, and safety in accordance with the WHO/EMA recommendations. At the same time the US regulatory requirements differ from those of other national authorities, including EMA (WHO), when it comes to the design of comparative quality studies (studies of products' physicochemical and biological properties), the assignment of International Non-Proprietary Names and the interchangeability of biosimilar products.

Key words: biosimilar products; biosimilars; extrapolation; interchangeability; authorisation of biosimilar products

For citation: Soldatov AA, Avdeeva ZhI, Bondarev VP, Mosyagin VD. Authorisation of non-innovator biotherapeutic (biosimilar) products in the USA. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(1):17–27. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-17-27>

Corresponding author: Aleksandr A. Soldatov; Soldatov@expmed.ru

Подготовка научных принципов, регламентирующих разработку и регистрацию биоподобных препаратов, была начата Европейским агентством по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) в 2000–2006 гг. Процесс подготовки первых документов в EMA проходил параллельно с регистрацией первых биоподобных препаратов. До 2010 г. в EMA были зарегистрированы первые биоподобные препараты (соматотропин, филграстим и эритропоэтин) и было отказано в лицензировании нескольких препаратов (интерфероны и инсулины). Опыт регистрации первых биоподобных препаратов послужил основой для пересмотра (обновления) уже существующих документов. На основании обновленных рекомендаций EMA в 2013–2018 гг. было зарегистрировано второе поколение биоподобных препаратов (инсулин, фолликулотропин и препараты на основе моноклональных антител).

Очень долго длились дебаты по поводу того, как назвать неоригинальные биотерапевтические препараты. На конференции в Сеуле, организованной Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), в 2009 г. было утверждено название biosimilars (биоподобные, биосимиляры, биоаналоговые). Выбор данного термина был обоснован тем, что демонстрация сходства биоподобного и оригинального препаратов основана на принципах, отличающихся от всех других, в том числе и от сравнительных исследований сопоставимости при внесении изменений в производственный процесс получения биотерапевтических препаратов.

С самого начала подготовки принципов регистрации биоподобных препаратов в EMA данную работу активно поддерживала ВОЗ. Основной целью ВОЗ является принятие единых (или гармонизированных) для всех национальных регуляторных органов мира принципов разработки и регистрации биоподобных препаратов. Для этого в ВОЗ были подготовлены нормативные требования на основе рекомендаций EMA¹.

Если в EMA в период, когда начали приближаться сроки окончания патентной защиты первых биотерапевтических препаратов, начали подготовку научных подходов для разработки и регистрации неоригинальных биотерапевтических препаратов, то в других странах этот процесс шел очень медленно, что связано в первую очередь с особенностями национальных регуляторных систем. Наиболее характерным примером является история принятия принципов биоподобных препаратов (biosimilars) в США. Первый нормативный документ, регламентирующий регистрацию данных препаратов, появился в 2012 г., но имевшаяся до этого нормативная база позволяла регистрировать неоригинальные биологические препараты, в том числе и биотерапевтические.

В работе представлен критический анализ современных нормативных требований, регламентирующих разработку и регистрацию неоригинальных (биоподобных) препаратов в США.

Неоригинальные биотехнологические препараты (follow on) в США

Пептиды, представляющие собой аминокислотную цепочку из менее чем 40 аминокислот, могут быть получены не только с использованием биотехнологических процессов (ферментация, экстракция, рекомбинантные технологии и др.), но и методом химического синтеза. Поэтому в США пептиды

и полипептиды, содержащие менее 100 аминокислот, полученные методом химического синтеза, длительное время не рассматривались как биологические препараты и регистрировались на основе Федерального закона о продуктах, лекарствах и косметических средствах (Federal Food, Drug and Cosmetic Act, FDCA), принятого в 1938 г.² Под эту категорию препаратов попадали такие препараты, как кальцитонин, инсулин и гепарины. Данные препараты должны быть переведены в группу биологических препаратов к 2020 г.

В 1984 г. в США был принят закон о ценовой конкуренции лекарств и продлении срока действия патентов (Drug Price Competition and Patent Term Restoration Act), который получил название закона Hatch-Waxman, допускающий регистрацию воспроизведенных (generic, дженерик) препаратов на основании сокращенной программы доклинических и клинических исследований³. Новая версия воспроизведенного препарата должна содержать то же действующее вещество и продемонстрировать биоэквивалентность с оригинальным препаратом. Ряд неоригинальных препаратов белковой природы (с короткой аминокислотной цепочкой) был зарегистрирован на основании данного закона. Аналогичная ситуация наблюдалась и в Канаде, где были зарегистрированы неоригинальные препараты гепаринов на основании требований для регистрации дженериков.

Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) требовало в ряде случаев проведения дополнительных исследований для оценки некоторых параметров неоригинальных препаратов⁴. Например, в 2006 г. FDA потребовало оценить иммуногенность препарата кальцитонин с учетом возможного риска участия консерванта препарата в развитии иммунного ответа на препарат [1].

До 2012 г. лицензирование оригинальных и неоригинальных препаратов в США осуществлялось на основании двух законов, позволяющих регистрировать, кроме химических, биологические препараты. В FDCA очень широко прописаны требования к лекарственным средствам, что позволяет в определенных случаях наряду с традиционными химическими препаратами лицензировать и биологические препараты. Биологические препараты также подпадают под юрисдикцию закона о государственном здравоохранении (Public Health Service Act, PHSA), в который в 1994 г. были отдельно включены требования, касающиеся этих препаратов. Контроль безопасности биологических препаратов осуществляется на основании закона о безопасности биологических препаратов (Biologics Control Act), принятого в 1902 г. [2].

Согласно PHSA биологический препарат не должен содержать примесей, должен быть безопасным и эффективным. Ранее в США заявитель представлял в FDA две заявки: для регистрации препарата и для получения лицензии на производство. Начиная с 1996 г. поэтапно была введена процедура выдачи единой лицензии на продажу биологического препарата и на его производство (Biological License Application, BLA). Выдача BLA не допускает использования сокращенной схемы лицензирования лекарственных препаратов.

В FDCA прописаны требования не только для регистрации оригинальных, но также имеются разделы, допускающие регистрацию неоригинальных препаратов. В частности, раздел

¹ Guideline on similar biological medicinal products (CHMP/437/04 Rev 1). EMA; 2014.

Annex 2. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). WHO Technical Report Series No. 977; 2013.

² Federal Food, Drug and Cosmetic Act (FD&C Act). <https://legcounsel.house.gov/Comps/Federal%20Food,%20Drug,%20And%20Cosmetic%20Act.pdf>

³ Administering the Hatch — Waxman Amendments: Ensuring a Balance between Innovation and Access; Public Meeting; Request for Comments; Extension of Comment Period. FDA; 2017. <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2017-09-19/pdf/2017-19904.pdf>

⁴ Public Health Service Act. <http://legcounsel.house.gov/Comps/PHSA-merged.pdf>

505(b)(2) FFDCА регламентирует регистрацию препарата в том случае, когда уже в зарегистрированный препарат вносятся новые дополнительные данные или изменения, повышающие его эффективность или безопасность (например, новое показание, новый способ применения, модификация производственного процесса и др.). В данном случае, согласно FFDCА, лицензируется «обновленный» препарат, но возможна и регистрация фактически нового неоригинального препарата на основании представления данных, касающихся «обновленного» препарата. Для регистрации препарата представляется информация о новых данных, которые вносятся в зарегистрированный препарат, и ссылки на известные материалы о зарегистрированном препарате.

В 2006 г. в Европе ЕМА начало регистрацию первых биоподобных препаратов, и некоторые фирмы попытались зарегистрировать эти препараты в США. В это время в США неоригинальные биотерапевтические препараты называли «биодженериками» (biogeneric).

Фирма Sandoz Inc. в 2004 г. подала заявку в FDA на регистрацию препарата Omnitrope (рекомбинантный соматотропин) на основании раздела 505(b)(2) FFDCА. При этом разработчики препарата ссылались на то, что производство препарата отличается от производства оригинального препарата Genotropin (Pfizer Inc.) и, соответственно, в новом препарате будут отличия в профиле эффективности. Для этого были представлены обширные результаты клинических исследований. Кроме того, было указано, что к 2006 г. FDA уже зарегистрировало 7 оригинальных препаратов рекомбинантных соматотропинов и, соответственно, молекула действующего вещества, входящего в состав препарата гормона роста (ГР), представляющая собой относительно простую белковую молекулу, была к тому времени хорошо изучена.

Эксперты FDA оказались в сложной ситуации, так как, с одной стороны, к тому времени не было опыта регистрации неоригинальных биотехнологических препаратов на основании укороченных сравнительных клинических исследований (первые биоподобные препараты (biosimilars) в ЕС были зарегистрированы только в 2006 г.). С другой стороны, формально не было препятствий для регистрации препарата Omnitrope на основании 505(b)(2) раздела FFDCА. Кроме того, в тот период в научной литературе шла активная дискуссия по проблемам регистрации неоригинальных биотехнологических препаратов на основании укороченной схемы разработки препаратов. В пользу использования укороченной схемы разработки был только один аргумент — низкая стоимость неоригинального препарата. Против использования данной схемы высказывалось больше аргументов, они касались в основном вопросов безопасности неоригинальных препаратов. Учитывая это, эксперты FDA под разными предложениями заявители обратились в суд, который в 2007 г. принял решение в пользу фирмы, и в этом же году препарат был зарегистрирован на основании раздела 505(b)(2) FFDCА [2].

Следует отметить, что при разработке препарата Omnitrope были проведены исследования в объеме значительно большем,

чем требуется для регистрации generic- и biosimilar-препаратов, объем исследований данного препарата приближался к объему исследований оригинального. Были представлены результаты сравнительных исследований физико-химических и биологических свойств, доклинической оценки первичной фармакодинамики (ФД), токсичности и результаты сравнительных клинических исследований Omnitrope и оригинального препарата Genotropin. Представленные данные вполне обоснованно позволили сделать FDA заключение о безопасности и эффективности препарата, но было указано, что препарат Omnitrope не является терапевтически эквивалентным оригинальному препарату Genotropin.

Учитывая, что объем исследований биотехнологических препаратов по укороченной схеме превышает объем исследований, необходимых для регистрации generic, неоригинальные биотехнологические препараты в США тогда и получили название follow on.

На основании раздела 505(b)(2) FFDCА в FDA были зарегистрированы, кроме Omnitrope, следующие препараты: рекомбинантный глюкагон для инъекций (Glucagon), рекомбинантная гиалуронидаза (Hylepex), рекомбинантный лососевый кальцитонин (Fortical) и два препарата гиалуронидазы (Hudase и Amphadase). При этом были отклонены заявки на регистрацию конъюгированных препаратов на основе эстрогенов мочи кобыл на основании того, что не все эстрогены, входящие в состав препарата, были охарактеризованы по физико-химическим и биологическим свойствам [1].

Нормативные требования для разработки и регистрации биоподобных препаратов в США

Опыт регистрации и клинического применения препаратов follow on в США и опыт регистрации первых биоподобных препаратов в ЕМА привели к необходимости пересмотра нормативных документов в США, касающихся разработки и лицензирования неоригинальных биотерапевтических препаратов. 23 марта 2010 г. президент США Б. Обама подписал закон о защите пациентов и доступной медицинской помощи (Patient Protection and Affordable Care Act, PPACA), в рамках которого был подготовлен закон о биологических инновационных препаратах и ценовой конкуренции (Biologics Price Competition and Innovation Act of 2009, BPCIA)⁵. Затем в BPCIA были включены дополнительные разделы, регламентирующие сокращенную программу разработки биоподобных препаратов (раздел 351(a) PHSA). В США очень долго проходили подготовка и широкое обсуждение документов, регламентирующих разработку и регистрацию биоподобных препаратов. Окончательная редакция трех ключевых документов была утверждена только в 2015 г.

В BPCIA дано следующее определение биоподобного препарата: «Препарат, который имеет сходство с референтным, несмотря на незначительные различия параметров, не связанных с клиническими эффектами, при отсутствии клинически значимых различий между разрабатываемым биоподобным и референтным препаратами по показателям чистоты, специфической активности и безопасности»⁶.

⁵ Notice 2011-35, Request for Comments on Funding of Patient-Centered Outcomes Research Through Fees Payable by Issuers of Health Insurance Policies and Self-Insured Health Plan Sponsors. Affordable Care Act Legal Guidance — Notices, Revenue Procedures and Revenue Rulings. <https://www.irs.gov/pub/irs-drop/n-11-35.pdf>

Biologics Price Competition and Innovation Act of 2009; Proposed Recommendations for a User Fee Program for Biosimilar and Interchangeable Biological Product Applications for Fiscal Years 2013 Through 2017; Notice of Public Meeting; Request for Comments. FDA; 2011. <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2011-12-07/pdf/2011-31499.pdf>

⁶ Clinical Pharmacology Data to Support a Demonstration of Biosimilarity to a Reference Product. Guidance for Industry. FDA; 2016. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM397017.pdf>

Для реализации закона ВРСІА в FDA была создана рабочая группа, ответственная за подготовку соответствующих нормативных документов и регистрацию биоподобных препаратов согласно разделу 351(k). Позже в рамках FDA был учрежден Комитет по биоподобным препаратам (Biosimilar Implementation Committee, BIC). В период с 2010 по 2015 г. FDA было подготовлено несколько документов, касающихся вопросов разработки и регистрации биоподобных препаратов в США, среди которых следует выделить следующие⁷:

- Clinical Pharmacology Data to Support a Demonstration of Biosimilarity to a Reference Product, December 2016;
- Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product, April 2015;
- Quality Considerations in Demonstrating Biosimilarity of a Therapeutic Protein Product to a Reference Product, April 2015;
- Formal Meetings between the FDA and Biosimilar Biological Product Sponsors or Applicants, November 2015. Procedural;
- Purple Book: Lists of Licensed Biological Products with Reference Product Exclusivity and Biosimilarity or Interchangeability Evaluations, September 2014;
- Reference Product Exclusivity Biological Products Filed Under Section 351(a) of the PHS Act, August 2014.

В целом рекомендации для изучения и регистрации биоподобных препаратов, принятые в США, не имеют принципиальных отличий от рекомендаций, принятых ЕМА. Однако в силу сложившейся национальной практики в США по некоторым аспектам имеются отличия с рекомендациями ЕМА (ВОЗ). В частности, это касается трактовки некоторых терминов, таких как biosimilarity и comparability, а также «сходные» и «высокое сходство».

При внесении изменений в производственный процесс получения биотерапевтического препарата проводится сравнительная оценка препаратов, получаемых одним производителем (так называемая «внутренняя» оценка) до и после внесения изменения в производственный процесс. Данные сравнительные исследования в документах ЕМА, FDA и Международного совета по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH), регламентирующих проведение сравнительных исследований при внесении изменений в производственный процесс, получили название «сопоставимость» (comparability). В случае разработки биоподобного препарата проводится сравнение препаратов, полученных разными производителями («внешнее» сравнение). Поэтому в ЕМА и ВОЗ после длительной дискуссии было принято решение «внешнее» сравнение называть biosimilarity (биоподобие), так как оно отличается от исследований comparability. Однако в документах FDA для характеристики как «внутреннего» сравнения, так и «внешнего» сравнения используют один термин comparability (сопоставимость). В FDA использование одного термина для различных сравнительных исследований аргументируют тем, что подход для изучения и разработки биоподобных препаратов был разработан на основе подхода «внутрен-

ней» сопоставимости (ICH Q5E). Данный документ впервые был разработан именно FDA в 1996 г., и только в 2004 г. ICH было отредактировано и утверждено Руководство ICH Comparability of Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in their Manufacturing Process Q5E.

С целью гармонизации применения терминов был проведен ряд консультаций между экспертами FDA и ЕМА. На заседании Европейской ассоциации производителей непатентованных лекарственных препаратов (European Generic Medicines Association (ЕGA)) в 2010 г. было декларировано, что ЕМА не ограничивает применение термина «сопоставимость» только для характеристики «внутреннего» сравнения, но и используют данный термин для характеристики сравнения биоподобного и оригинального (референтного) препаратов.

Особенности разработки и оценки качества биоподобных препаратов в США

Основные принципиальные положения доказательства сходства биоподобного и оригинального препаратов по показателям качества, эффективности и безопасности в рекомендациях FDA для разработки биоподобных препаратов соответствуют подходам ЕМА/ВОЗ⁸. Но нормативные документы FDA содержат ряд дополнений процедурного характера и рекомендации более подробной оценки сходства физико-химических и биологических свойств биоподобного и оригинального (референтного) препаратов в сравнении с рекомендациями ВОЗ/ЕМА. Это в первую очередь касается следующих аспектов разработки биоподобных препаратов:

- рекомендуется, чтобы разработчик (спонсор) очень подробно обсудил всю программу разработки биоподобного препарата с экспертами FDA до начала разработки биоподобного препарата;
- в качестве референтного препарата может быть использован препарат, зарегистрированный в FDA. В дополнение к референтному препарату (зарегистрированному в FDA), чтобы избежать ненужного дублирования исследований на животных и снижения объема сравнительных клинических исследований, может быть использован препарат, не зарегистрированный в США. Для этого необходимо привести не только результаты сравнительных исследований этого препарата с референтным препаратом (зарегистрированным в FDA) по показателям качества, но и сравнительную характеристику фармакокинетики (ФК);
- для формирования вывода о сходстве физико-химических и биологических свойств биоподобного и оригинального (референтного) препаратов в документах FDA рекомендуется использование методов «совокупности данных» и «отпечатка пальца», что значительно повышает потенциал выявления любых различий между биоподобным и оригинальным (референтным) препаратами. Данный подход обеспечивает более высокий уровень научного обоснования сходства и позволяет проводить более селективные и целенаправленные доклинические (*in vivo*) и/или клинические исследования;

⁷ Clinical Pharmacology Data to Support a Demonstration of Biosimilarity to a Reference Product. Guidance for Industry. FDA; 2016.

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM397017.pdf>

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM291128.pdf>

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM291134.pdf>

<http://wsqms.com/newsletter/files/25/15085fnl.pdf>

<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/Biosimilars/ucm411418.htm>

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM407844.pdf>

⁸ Guideline on similar biological medicinal products (CHMP/437/04 Rev 1). EMA; 2014.

Annex 2. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). WHO Technical Report Series No. 977; 2013.

Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product. Guidance for Industry. FDA; 2015.

- в процессе сравнительных исследований физико-химических и биологических свойств биоподобного и оригинального препаратов может быть установлена «остаточная неопределенность», т.е. результаты сравнительной оценки показателя, которые не позволяют с высоким уровнем достоверности сделать заключение о сходстве/различии сравниваемых показателей или сделать заключение о клинической значимости установленных различий. Поэтому объем и программа (дизайн) доклинических и клинических исследований определяются с учетом характеристики «остаточной неопределенности».

Для сравнительной оценки биоподобного и оригинального препаратов по атрибутам качества рекомендуется подход, получивший название «отпечаток пальца» (рис. 1)⁹. Согласно данному подходу необходимо продемонстрировать (оценить) сходство биоподобного и референтного препаратов по всем параметрам (первичная структура и структуры высшего порядка, примеси, посттрансляционные модификации, биологическая активность и др.), составляющим профиль качества конкретного биотерапевтического препарата. Данный подход дополняется методом «совокупности данных», рекомендуемым использование нескольких высокочувствительных,

в том числе и ортогональных (основанных на разных принципах оценки показателя), аналитических методов для параметра качества.

Рекомендованные для разработки и регистрации биоподобных препаратов в FDA подходы («совокупность данных», «отпечаток пальца», оценка «остаточной неопределенности» и др.) не противоречат, а, наоборот, дополняют принципы, разработанные EMA для оценки качества биоподобных препаратов.

После того как выполнены все сравнительные исследования первого этапа (оценка качества), на основании результатов данного исследования формируется заключение о степени сходства физико-химических и биологических свойств биоподобного и оригинального препаратов. Согласно руководству FDA (Clinical pharmacology data to support a demonstration of biosimilarity to a reference product) возможны следующие выводы о степени сходства биоподобного и оригинального (референтного) препаратов:

- недостаточное аналитическое сходство (insufficient analytical similarity) — в процессе сравнительных исследований выявлены значительные различия, которые не позволяют сделать заключение о сходстве биоподобного и референтного

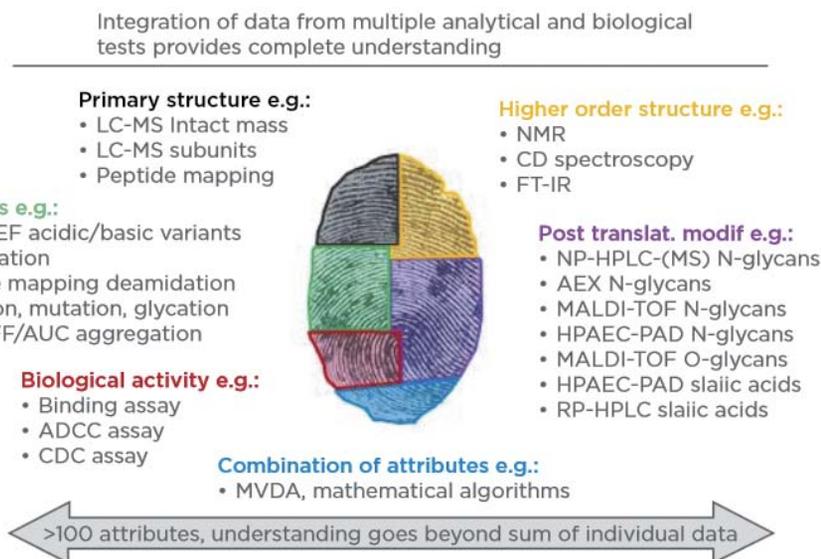


Рис. 1. Схема метода «отпечаток пальца» для демонстрации сходства биоподобного и оригинального препаратов¹⁰. ADCC — антителозависимая клеточная цитотоксичность; AEX — анионный обмен; AUC — аналитическое ультрацентрифугирование; CD — круговой дихроизм; CDC — комплемент-зависимая цитотоксичность; CEX — катионный обмен; cIEF — капиллярное изоэлектрическое фокусирование; FFF — проточное фракционирование в силовом поле; FT-IR — инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием; HPAEC-PAD — высокоэффективная анионообменная хроматография с импульсным амперометрическим детектированием; LC — жидкостная хроматография; LC-MS — жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием; MALDI-TOF — времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией; MVDA — многопараметровый анализ данных; NMR — ядерный магнитный резонанс; NP-HPLC-(MS) — нормально-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием; RP-HPLC — обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; SEC — эксклюзионная хроматография.

Fig. 1. Scheme of the «fingerprint» test method for demonstration of comparability between biosimilar and innovator products. ADCC — antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; AEX — anion exchange; AUC — analytical ultracentrifugation; CD — circular dichroism; CDC — complement dependent cytotoxicity; CEX — cation exchange; cIEF — capillary isoelectric focusing; FFF — field flow fractionation; FT-IR — fourier transform-infrared; HPAEC-PAD — high performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detection; LC — liquid chromatography; LC-MS — liquid chromatography-mass spectrometry; MALDI-TOF — matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight; MVDA — multivariate data analysis; NMR — nuclear magnetic resonance; NP-HPLC-(MS) — normal phase-high performance liquid chromatography-(mass spectrometry); RP-HPLC — reverse phase-high performance liquid chromatography; SEC — size-exclusion chromatography.

⁹ Quality Considerations in Demonstrating Biosimilarity of a Therapeutic Protein Product to a Reference Product. Guidance for Industry. FDA; 2015.

¹⁰ Biosimilars in hematology: increasing choice, expanding access. Summary of Presentations from the Sandoz Biopharmaceuticals-Sponsored Educational Session, which was part of the «Updates-in-Hematology» Programme, held at the 19th EHA Congress, Milan, Italy, on 11th June 2014. <https://emj.europeanmedical-group.com/wp-content/uploads/sites/2/2018/02/Biosimilars-in-Hematology-Increasing-Choice-Expanding-Access.pdf>

препаратов. Поэтому необходимо внести соответствующие изменения в производственный процесс или разрабатывать далее препарат в качестве оригинального;

- аналитическое сходство с остаточной неопределенностью (analytical similarity with residual uncertainty) — продемонстрировано сходство биоподобного и референтного препаратов и выявлены некоторые различия между препаратами. Для характеристики выявленных различий необходимо проведение дополнительных исследований. Например, если выявлено различие в профиле гликозилирования сравниваемых препаратов, то рекомендуется проведение сравнительных ФК- и ФД-исследований для оценки влияния различий гликозилирования на ФК и ФД свойства препарата;

- ориентировочное аналитическое сходство (tentative analytical similarity) — продемонстрировано высокое сходство по атрибутам качества биоподобного и оригинального (референтного) препаратов, но для характеристики остаточной неопределенности требуется проведение выборочных целенаправленных (targeted and selective) доклинических или клинических исследований для характеристики выявленных неопределенностей;

- высокое аналитическое сходство, установленное на основе подхода «отпечатка пальца» (fingerprint-like analytical similarity) — результаты сравнительных исследований с высоким уровнем достоверности свидетельствуют о сходстве атрибутов качества биоподобного и референтного препаратов. Это позволяет на следующем этапе разработки проводить выборочные направленные (targeted and selective) доклинические или клинические исследования.

Промежуточный вывод о степени сходства физико-химических и биологических свойств биоподобного и референтного препаратов позволяет учитывать особенности биоподобного препарата при составлении программы целенаправленных исследований на этапах доклинических и клинических исследований.

На этапе доклинических исследований FDA рекомендует проведение сравнительных исследований с использованием релевантных видов животных, программа исследования которых должна быть составлена с учетом результатов сравнительной оценки физико-химических и биологических свойств биоподобного и референтных препаратов. Однако в некоторых ситуациях (например, при отсутствии релевантных видов животных) доклинические исследования токсичности могут быть проведены до начала клинических исследований с использованием нерелевантных видов животных для оценки токсичности препарата. При необходимости могут быть проведены несравнительные исследования ФК, ФД и токсичности при однократном введении биоподобного препарата.

Доклинические исследования биоподобных препаратов должны быть выполнены с учетом рекомендаций ICH S6(R1) и GLP. Результаты оценки иммуногенности, полученные на животных, сложно экстраполировать на человека. Но антитела к препарату оказывают существенное влияние на фармакокинетические и фармакодинамические свойства биотерапевтических препаратов. Поэтому FDA рекомендует при проведении исследований на животных контролировать выработку антител к препарату, что необходимо для объективной характеристики ФК- и ФД-свойств препарата.

Следует отметить, что оценка сходства двух препаратов проводится не только для регистрации новой версии неори-

гинального препарата или при внесении изменений в производственный процесс, но и при присвоении статуса орфанного новому оригинальному препарату, при наличии уже оригинального препарата, имеющего статус орфанного. Причем понятие сходство/подобие (biosimilarity) впервые начали применять при регистрации орфанных препаратов именно в США. В частности, в США был зарегистрирован в качестве орфанного препарата Avonex (интерферон α -1a). Для того чтобы присвоить статус орфанного препарату Rebif, разработчикам необходимо было продемонстрировать, что его качество, эффективность и безопасность не ниже или даже выше зарегистрированного орфанного препарата Avonex. Была подана заявка в FDA о признании сходства (biosimilarity) препарата Rebif с Avonex. В процессе экспертизы было установлено, что между молекулами действующего вещества имеются различия. Но было продемонстрировано терапевтическое превосходство препарата Rebif, вероятно, обусловленное физико-химическими свойствами молекулы действующего вещества, профилем примесей, особенностями формулирования, путями введения и др. Данные выводы были сделаны на основании проведенных сравнительных клинических исследований¹¹. Это один из редких случаев, когда превосходство одного препарата над другим установлено не на основании его более высокой безопасности, а на его эффективности.

Вопросы экстраполяции

Высокое сходство физико-химических и биологических свойств, эффективности и безопасности биоподобного и оригинального препаратов, продемонстрированное в одном исследовании на ограниченной популяции добровольцев, позволяет экстраполировать результаты оценки эффективности и безопасности для одного показателя к применению препарата на другие, утвержденные для оригинального препарата. Экстраполяция возможна при соответствующем научном обосновании. Основным условием, которое позволяет экстраполировать результаты исследования по одному показанию на другие, является наличие единого механизма действия препарата при разных патологических процессах, обусловленных взаимодействием с одним и тем же рецептором/лигандом при разных заболеваниях. В случае если препарат взаимодействует с разными рецепторами при разных заболеваниях или действующее вещество препарата имеет не один, а несколько активных центров, то может потребоваться проведение дополнительных исследований для обоснования экстраполяции на другие показания.

В процессе регистрации первых биоподобных препаратов (соматотропин, эритропоэтин и филграстим) различными национальными регуляторными органами практически не было проблем с экстраполяцией, так как механизм действия данных препаратов при всех заболеваниях и в норме обусловлен взаимодействием с одним рецептором. Острая дискуссия по проблеме экстраполяции развернулась, когда началась регистрация препаратов на основе моноклональных антител. Первый биоподобный препарат на основе моноклональных антител СТ-Р13 (инфликсимаб) был разработан и производится в Южной Корее компанией Celltrion, зарегистрирован в EMA под двумя торговыми названиями Remsima® (Celltrion) и Inflecta® (Hospira), и в FDA (Inflecta® (Hospira)) с показаниями для лечения ревматоидного артрита (РА), анкилозирующего спондилоартрита, псориаза, псориазического артрита, болезни Крона

¹¹ Memorandum. Comparative Study of Rebif to Avonex and Orphan Exclusivity. FDA; 2002.

<https://web.archive.org/web/20170119061110/http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/ucm094510.pdf>

и язвенного колита у взрослых и детей. Препарат был лицензирован на основе демонстрации эквивалентности фармакокинетики (СТ-Р13 и референтного препарата) в популяциях больных анкилозирующим спондиллоартритом и РА и демонстрации сходства эффективности и безопасности у больных с ревматоидным артритом¹².

Препараты моноклональных антител, в сравнении с другими группами генно-инженерных биотерапевтических препаратов, имеют высокую молекулярную массу, что повышает риск проявления иммуногенности; появление нейтрализующих антител сопровождается снижением их эффективности. Проблемы иммуногенности препаратов моноклональных антител анти-TNF (антитела, связывающие фактор некроза опухоли) особенно актуальны при лечении детей, что обусловлено более длительным курсом их лечения.

Считается, что при ревматоидном артрите инфликсимаб преимущественно вызывает нейтрализацию растворимого и трансмембранного ФНО (фактор некроза опухоли), а при воспалительных заболеваниях (например, болезнь Крона) эффективность инфликсимаба обусловлена инициацией апоптоза и антителозависимой цитотоксичностью (ADCC). В процессе сравнительных исследований СТ-Р13 и оригинального препарата между ними были выявлены различия по уровню афукозилирования, которое опосредует ADCC препаратов моноклональных антител. При этом в сравнительных исследованиях *in vitro* были выявлены различия ADCC между СТ-Р13 и оригинальным препаратом. Учитывая, что клинические сравнительные исследования СТ-Р13 были проведены при лечении больных РА, эксперты Министерства здравоохранения Канады посчитали, что экстраполяция результатов изучения эффективности и безопасности, полученных при лечении аутоиммунного заболевания (РА), на показания для лечения воспалительных заболеваний кишечника (язвенный колит и болезнь

Крона) у взрослых и особенно детей необоснованна. Препарат СТ-Р13 был зарегистрирован в Канаде с показаниями для лечения только аутоиммунных заболеваний в дозе 3 мг/кг (в ЕМА до 10 мг/кг), а спонсорам было рекомендовано проведение дополнительных исследований [3].

Следует отметить, что свое осторожное отношение к экстраполяции активно высказывали многие ассоциации врачей, в первую очередь специалисты по детским болезням [4–6]. Поэтому при лицензировании следующих биоподобных препаратов к вопросам экстраполяции стали относиться более внимательно. При регистрации следующих препаратов из группы анти-ФНО (адалимумаб и инфликсимаб) в FDA не все показания, утвержденные для оригинальных препаратов, были утверждены (экстраполированы) для биоподобных препаратов (табл. 1).

Международное непатентованное наименование (МНН) биоподобного препарата

При регистрации препарата ему присваивается МНН — уникальное наименование действующего вещества лекарственного средства. В большинстве стран МНН регистрируемым препаратам присваивает Комитет экспертов ВОЗ по спецификациям для лекарственных средств (WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations). Однако в некоторых странах (США, Великобритания, Япония) имеются собственные системы присвоения наименования действующего вещества лекарственному средству. В частности, в США лекарственным средствам присваивается непатентованное наименование (Nonproprietary Naming, NN) на основе национальной системы присвоения непатентованного наименования (United States Adopted Name — USAN). Для большинства препаратов NN, присвоенные в США, и МНН, присвоенные ВОЗ

¹² Assessment report. Inflectra (EMA/CHMP/589422/2013). EMA; 2013.

Таблица 1. Показания к применению оригинального и биоподобных препаратов анти-ФНО, которые были утверждены при регистрации препаратов в FDA

Table 1. Indications for use of innovator and biosimilar anti-TNF products that were approved during authorisation of the products by FDA

Препараты	Ревматоидный артрит	Ювенильный идиопатический артрит	Псориазический и бляшечный артрит	Анкилозирующий спондилит	Болезнь Крона		Язвенный колит		Гнойный гидраденит	Увеит
					взрослые	дети	взрослые	дети		
Адалимумаб (оригинальный препарат Humira)										
Humira (adalimumab)	+	+	+	+	+	+	+	п.о.	+	+
Amjevita (adalimumab-atto)	+	+	+	+	+	-	+	п.о.	-	-
Cyltezo (adalimumab-adbm)	+	+	+	+	+	-	+	п.о.	-	-
Инфликсимаб (оригинальный препарат Remicade)										
Remicade (infliximab)	+	п.о.	+	+	+	+	+	+	п.о.	п.о.
Inflecta (infliximab dyyb)	+	п.о.	+	+	+	+	+	+	п.о.	п.о.
Renflexis (infliximab-abda)	+	п.о.	+	+	+	+	+	-	п.о.	п.о.
Ixifi (infliximab-qbtx)	+	п.о.	+	+	+	+	+	-	п.о.	п.о.

Примечание. «+» — утвержденные показания, «-» — неутвержденные показания, «п. о.» — показание для препарата отсутствует.

соответствующим препаратам, совпадают, различия встречаются в единичных случаях. ВОЗ для присвоения МНН препаратам на основе моноклональных антител рекомендует использовать подходы, прописанные в USAN.

По вопросу присвоения МНН биоподобным препаратам в ЕМА была обоснована позиция, что МНН биоподобного препарата должно соответствовать МНН оригинального (референтного) препарата. Данный подход поддерживается национальными регуляторными органами многих стран, различными международными организациями и ассоциациями, так как это позволяет смягчить проблемы взаимозаменяемости биоподобного и оригинального препаратов и стимулировать продвижение биоподобных препаратов на рынке.

Учитывая, что при разработке биоподобного препарата невозможно получить идентичную «копию» оригинального препарата, и учитывая сложность структуры молекул биотерапевтических препаратов, ряд национальных регуляторных органов и в первую очередь ВОЗ считают, что присвоение биоподобному препарату МНН, единого с оригинальным препаратом, недопустимо. Единый МНН для биоподобного и оригинального препаратов создает путаницу (учитывая, что они различаются по некоторым параметрам) и, самое главное, не позволяет обеспечить объективный мониторинг безопасности биоподобного препарата¹³.

Позиция ВОЗ основывается на том, что фармаконадзор эффективен только в том случае, если все биотерапевтические препараты одной группы можно легко идентифицировать и отличить друг от друга, чтобы точно отслеживать частоту развития и тяжесть побочных реакций (ПР) на конкретные препараты. В настоящее время активный и пассивный мониторинг побочных реакций при фармаконадзоре основан на учете МНН препарата. Если препарат имеет какие-либо отличия от референтного препарата, но то же самое МНН, это может привести к ложным сигналам безопасности для препаратов, имеющих один МНН. В частности, в США и некоторых других странах в течение длительного времени к химическим препаратам относились препараты, белковая молекула которых содержала менее чем 100 аминокислот (гепарины, кальцитонин), и их неоригинальные препараты регистрировались как дженерики. При анализе данных мониторинга безопасности в базе MedWatch (FDA) препаратов эноксапарина было установлено, что более часто ПР развиваются при применении дженериков гепарина, чем оригинальных препаратов [7].

Присвоение биоподобному препарату МНН, отличающегося от наименования оригинального препарата, позволит врачам иметь больше информации при назначении биоподобных препаратов. Исследование среди практикующих терапевтов показало, что более 75 % специалистов, назначающих препараты, считают, что препараты с одним МНН структурно идентичны. Кроме того, 70 % опрошенных специалистов считают, что все препараты с одним МНН имеют одни и те же параметры эффективности и безопасности, что не всегда соответствует действительности [8].

Кроме того, при лицензировании препаратов на основе сложных молекул (например, моноклональных антител) в регуляторных органах развитых стран (FDA, ЕМА) очень часто для

биоподобного препарата не утверждаются (экстраполируются) все показания к применению, указанные для соответствующих оригинальных препаратов.

Позиция ВОЗ была поддержана (например, США, Японией). В США биоподобным препаратам присваивается NN оригинального препарата, к которому добавляется суффикс из четырех букв. В частности, биоподобному препарату Zarxio® FDA было присвоено NN — Filgrastim-sndz, которое составлено из NN референтного препарата (Filgrastim) с добавлением суффикса sndz, являющегося аббревиатурой названия компании Sandoz производителя препарата. Аналогично биоподобному препарату Inflectra был присвоен NN — infliximab-dyyb, а Renflexis — infliximab-abda. В Японии биоподобным препаратам присваивается NN референтного препарата с обязательным добавлением BS (biosimilars product) и цифры (1, 2 или 3), которые показывают порядковый номер лицензированного биоподобного препарата (например, Filgrastim BS 1, Filgrastim BS 2, Filgrastim BS 3 или Insulin glargine BS 1 и Insulin glargine BS 2)¹⁴.

Основная информация о биологических, в том числе и биотерапевтических препаратах, зарегистрированных в FDA, представлена в документе, который получил название «Пурпурная книга» (Purple Book)¹⁵. В документе, кроме названия, указано происхождение препарата (оригинальный или биоподобный), его эксклюзивность, взаимозаменяемость и др. В настоящее время в FDA зарегистрировано 9 биоподобных препаратов (табл. 2).

Взаимозаменяемость

Согласно международным и национальным рекомендациям оригинальный препарат может быть взаимозаменяемым с биоподобным при демонстрации их терапевтической эквивалентности.

В заявке на регистрацию биоподобного препарата в FDA (согласно разделу 351(k)) может быть указана оценка взаимозаменяемости препарата. Заявление для оценки взаимозаменяемости может быть подано и отдельно, после регистрации биоподобного препарата. При этом регистрация биоподобного препарата не является автоматическим признанием его взаимозаменяемости. Если продемонстрирован самый высокий уровень сходства/сопоставимости, то такой препарат получает статус «взаимозаменяемый».

В документах FDA, касающихся вопросов качества биоподобных препаратов, указано, что на основании результатов сравнительных исследований по атрибутам качества можно выделить 4 степени сходства биоподобного и оригинального препаратов: нет сходства, имеется сходство, высокое сходство и очень высокое сходство (как отпечатки пальцев). Если продемонстрировано самое высокое сходство между биоподобным и референтным препаратами, то такому биоподобному препарату присваивается статус «взаимозаменяемый». Хотя само понятие «взаимозаменяемость» еще четко не определено в документах FDA. Предполагается (раздел 351(1)(3) PHS), что биоподобный препарат может быть признан взаимозаменяемым при соблюдении трех условий:

- продемонстрировано высокое сходство (biosimilarity) с оригинальным (референтным) препаратом;

¹³ 55th Consultation on International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances. Geneva, 16–18 October 2012. Executive summary. WHO; 2013.

¹⁴ Nonproprietary Naming of Biological Products. Guidance for Industry. FDA; 2017.

Guideline for the Quality, Safety, and Efficacy Assurance of Follow-on Biologics (PFSB/ELD Notification No. 0304007). Pharmaceuticals and Medical Devices Agency; 2009. <https://www.pmda.go.jp/files/000153851.pdf>

¹⁵ Purple Book: Lists of Licensed Biological Products with Reference Product Exclusivity and Biosimilarity or Interchangeability Evaluations. <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/Biosimilars/ucm411418.htm>

Таблица 2. Биоподобные препараты, зарегистрированные в США
 Table 2. Biosimilar products authorised in the USA

Торговое название	МНН	Дата регистрации	Производитель
Zarxio	filgrastim-sndz	03/06/15	Sandoz
Erelzi	etanercept-szsz	08/30/16	Sandoz
Inflixtra	infliximab-dyyb	04/05/16	Celltrion
Renflexis	infliximab-abda	04/21/17	Samsung bioepis CO LTD
Ixifi	infliximab-qbtx	12/13/17	Pfizer INC
Cyltezo	adalimumab-adbm	08/25/17	Boehringer ingelheim
Amjevita	adalimumab-atto	09/23/16	Amgen INC
Mvasi	bevacizumab-awwb	09/14/17	Amgen INC
Ogivri	trastuzumab-dkst	12/01/17	Mylan GMBH

- показана та же эффективность, что и у оригинального (референтного) препарата;

- риск при применении биоподобного препарата с точки зрения безопасности или снижения эффективности не выше, чем риск применения оригинального (референтного) препарата.

Согласно нормативным документам FDA, теоретически в процессе сравнительных исследований биоподобного и оригинального препаратов (с целью регистрации биоподобного) можно продемонстрировать высокое сходство препаратов и их терапевтическую эквивалентность. США — единственная страна мира, которая подготовила документ для производителей, в котором описаны рекомендации для составления программы исследований (дизайна) и дополнительные исследования, необходимые для обоснования возможности взаимозаменяемости биоподобного препарата с оригинальным (Considerations in Demonstrating Interchangeability with a Reference Product Guidance for Industry)¹⁶. Следует отметить, что документ не является обязательным для исполнения, а носит рекомендательный характер.

Процедурные вопросы

Еще одна сторона различия подходов при регистрации биоподобных препаратов в FDA связана с тем, что процедура принятия решения о лицензировании препарата в FDA отличается от процедуры в других национальных регуляторных органах, например EMA. Регистрацией лекарственных средств в EMA занимается Комитет по лекарственным средствам для применения у человека (Committee for Medicinal Products for Human Use, CHMP). В составе CHMP организованы подразделения, которые называются Рабочими группами (Working parties) или Временными рабочими группами. В составе CHMP создана Рабочая группа по биологическим препаратам (Biologics Working Party, BWP), которая представляет свои рекомендации по всем вопросам, прямо или косвенно связанным с качеством и безопасностью биологических и биотехнологических препаратов. В задачи BWP входит оказание поддержки CHMP при рассмотрении регистрационных досье. Отчет, предоставляемый BWP по каждой заявке на лицензирование биологических/биотехнологических препаратов, содержит рекомендацию, можно или нет регистрировать данный препарат, аргументированный перечень спорных моментов, вопросов к заявителю и пред-

ложений по улучшению ситуации. Кроме того, BWP совместно с другими группами занимается подготовкой руководств, обеспечивает общение с заинтересованными сторонами (ассоциациями фармацевтических компаний, организациями специалистов здравоохранения и пациентов и т.д.), отвечает за международное сотрудничество по вопросам качества и безопасности биологических и биотехнологических ЛС, организует специализированные тренинги и семинары и др.

Окончательное решение о выдаче лицензии на биологические и биотехнологические препараты принимает CHMP EMA. Комитет CHMP представлен в основном экспертами, из которых назначают докладчика и содокладчика, которые должны представить характеристику препарата (научное обсуждение). Остальные члены CHMP могут задавать вопросы для рассмотрения. Принятие решения о регистрации препарата осуществляется на основе голосования. С юридической точки зрения разработка и лицензирование биоподобных препаратов в EMA представляет собой процедуру, которая отличается от обычного пути регистрации оригинальных препаратов.

BWP состоит из экспертов, выбранных из общего списка экспертов EMEA (по одному человеку из каждой страны-участницы). Работа BWP на каждый календарный год регламентируется планом, который содержит также даты проведения заседаний (11 заседаний в год). И хотя биоподобные препараты входят в сферу ответственности BWP, в EMEA была создана отдельная временная рабочая группа по биоподобным препаратам (Similar Biological (Biosimilar) Medicinal Products Working Party (BMWP)). Основной целью формирования группы было предоставление комитету рекомендации по доклиническим и клиническим вопросам, прямо или косвенно связанным с биоподобными препаратами.

В состав BMWP входят 8 экспертов, из них 2 представляют рабочую группу по эффективности (Efficacy Working party — EWP) и 2 — рабочую группу по безопасности (Safety Working party — SWP). BMWP работает в соответствии со своей программой, утверждаемой комитетом ежегодно, и проводит заседания 3 раза в год. В задачи BMWP входит подготовка, рецензирование и обновление руководств для того, чтобы удостовериться, что вопросы разработки и изучения биоподобных препаратов освещены в них полноценно; предоставление научных рекомендаций комитету и рабочим группам по вопросам, связанным с биоподобными препара-

¹⁶ Considerations in Demonstrating Interchangeability With a Reference Product. Guidance for Industry. Draft Guidance. FDA; 2017.

тами; обсуждение вопросов с международными организациями и заинтересованными сторонами; организация тренингов и семинаров.

В США в структуре FDA имеются два отдельных комитета: Центр по оценке и исследованиям лекарственных средств (Center for Drug Evaluation and Research (CDER)) и Центр по оценке и исследованиям биологических лекарственных средств (Center for Biologics Evaluation and Research (CBER)), причем последний является регуляторным органом для биологических лекарственных средств.

CDER действует на основании федерального закона о пищевых продуктах и лекарственных средствах (Federal Food, Drug, and Cosmetic Act) (1938), описывающего и подачу заявки на получение разрешения на маркетинг (New Drug Application, NDA). Деятельность CBER регламентируется законом об общественном здравоохранении (Public Health Service Act).

В FDA решение о выдаче лицензии на биологический препарат (BLA) принимают члены нескольких комитетов, которые представлены в основном специалистами-терапевтами. Поэтому принятие решения происходит на основе анализа совокупности данных, которые подготовили терапевты различных специальностей. При этом юридически в США биоподобный препарат рассматривается как новый препарат. В частности, это отражается и в том, что NN на биоподобный препарат отличается от NN референтного препарата, в то время как в ЕС биоподобный и референтный препараты имеют одно МНН.

Заключение

Нормативно-правовая база, регламентирующая разработку, оценку качества, эффективности и безопасности, лицензирования и применения биоподобных препаратов в США, гармонизирована с основными рекомендациями ЕМА и ВОЗ. При этом ряд рекомендаций, касающихся вопросов оценки качества, подготовки программ доклинических и клинических исследований и др., описаны более подробно, чем в рекомендациях ЕМА (ВОЗ). По ряду проблем, таких как присвоение МНН, FDA поддержало рекомендации ВОЗ, а не ЕМА, данные различия обусловлены сложившейся национальной практикой в FDA.

В настоящее время неуклонно увеличивается количество неоригинальных биотерапевтических препаратов. В нашей стране и странах — членах ЕАЭС идет работа по подготовке нормативной базы, регламентирующей разработку и регистрацию современных препаратов, в том числе и биоподобных. Нормативная база, опыт разработки и регистрации биоподобных препаратов в США могут быть использованы для подготовки соответствующих отечественных документов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 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. 056-00154-19-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (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. Dudzinski DM, Kesselheim AS. Scientific and legal viability of follow-on protein drugs. *N Engl J Med.* 2008;358(8):843–9. <https://doi.org/10.1056/NEJMhle0706973>
2. Carver KH, Elikan J, Lietzan E. An unofficial legislative history of the Biologics Price Competition and Innovation Act of 2009. *Food Drug Law J.* 2010;65(4):671–818.
3. Scott BJ, Klein AV, Wang J. Biosimilar monoclonal antibodies: A Canadian regulatory perspective on the assessment of clinically relevant differences and indication extrapolation. *J Clin Pharmacol.* 2015;55(S3):S123–32. <https://doi.org/10.1002/jcph.339>
4. Fonseca JE, Gonçalves J, Araújo F, Cordeiro I, Teixeira F, Canhão H, et al. The Portuguese Society of Rheumatology position paper on the use of biosimilars. *Acta Reumatol. Port.* 2014;39(1):60–71.
5. Fiorino G, Girolomoni G, Lapadula G, Orlando A, Danese S, Olivieri I. The use of biosimilars in immune-mediated disease: A joint Italian Society of Rheumatology (SIR), Italian Society of Dermatology (SIDeMaST), and Italian Group of Inflammatory Bowel Disease (IG-IBD) position paper. *Autoimmun Rev.* 2014;13(7):751–5. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.02.004>
6. Argüelles-Arias F, Barreiro-de-Acosta M, Carballo F, Hinojosa J, Tejerina T. Joint position statement by «Sociedad Española de Patología Digestiva» (Spanish Society of Gastroenterology) and «Sociedad Española de Farmacología» (Spanish Society of Pharmacology) on biosimilar therapy for inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig.* 2013;105(1):37–43.
7. Grapp G, Bonafede M, Felix T, Li E, Malecki M, Sprafka JM. Active and passive surveillance of enoxaparin generics: A case study relevant to biosimilars. *Expert Opin Drug Saf.* 2015;14(3):349–60. <https://doi.org/10.1517/14740338.2015.1001364>
8. Camacho LH, Frost CP, Abella E, Morrow PK, Whittaker S. Biosimilars 101: considerations for U.S. oncologists in clinical practice. *Cancer Med.* 2014;3(4):889–99. <https://doi.org/10.1002/cam4.258>

Об авторах

Солдатов Александр Алексеевич, д-р мед. наук, главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-6624-2692>

Авдеева Жанна Ильдаровна, д-р мед. наук, профессор, главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9377-1378>

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

Мосягин Вячеслав Дмитриевич, д-р мед. наук, профессор, начальник управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0269-8337>

Поступила 15.10.2018
После доработки 07.02.2019
Принята к публикации 14.02.2019

Authors

Aleksandr A. Soldatov, Doctor of Medical Sciences, Chief Expert of the Division for Expert Evaluation of Allergenes, Cytokines and other Immunomodulators of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-6624-2692>

Zhanna I. Avdeeva, Doctor of Medical Sciences, Professor, Chief Expert of the Division for Expert Evaluation of Allergenes, Cytokines and other Immunomodulators of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9377-1378>

Vladimir P. Bondarev, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-6472-6386>

Vyacheslav D. Mosyagin, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Division for Expert Evaluation of Allergenes, Cytokines and other Immunomodulators of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0269-8337>

Received 15 October 2018
Revised 7 February 2019
Accepted 14 February 2019

Обоснование методических подходов к экспертной оценке подлинности биомедицинских клеточных продуктов

Е. В. Мельникова^{1,*}, О. А. Рачинская¹, Г. А. Трусов¹, М. Д. Хорольский¹, И. С. Семенова¹,
Н. В. Терешкина¹, В. А. Меркулов^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

²Федеральное 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

На каждый разработанный биомедицинский клеточный продукт (БМКП), прошедший доклинические исследования, производитель (разработчик) составляет спецификацию, которая входит в состав регистрационного досье при подаче заявления на государственную регистрацию БМКП. В соответствии с Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19 января 2017 г. № 14н «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт» спецификация должна содержать сведения об идентичности (подлинности) клеточной линии, входящей в состав БМКП, которая включает: морфологические характеристики, экспрессию специфических маркеров, экспрессию специфических генов, экспрессию специфических белков, а также маркеры стабильности клеточной линии. В Российской Федерации на сегодняшний день отсутствует практический опыт проведения экспертизы качества БМКП. **Цель работы:** обоснование методических подходов к определению идентичности (подлинности) клеточных линий, входящих в состав БМКП, в рамках экспертизы качества на модельной клеточной линии DF-2 при использовании методов, позволяющих характеризовать морфологический, генетический, иммунофенотипический и цитогенетический профиль клеточной линии. **Материалы и методы:** объектом исследования была клеточная линия DF-2 — дермальные фибробласты человека (мезенхимные стволовые клетки) — получена из Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). В работе использовали следующие методы анализа: морфологический анализ; метод проточной цитометрии для иммунофенотипирования модельной клеточной линии DF-2; метод коротких tandemных повторов для построения аллельного профиля модельной клеточной линии; цитогенетическое исследование — DAPI-дифференциальное окрашивание метафазных хромосом. **Результаты:** в статье представлены методические подходы к определению подлинности препаратов, содержащих жизнеспособные клетки человека (аналогов БМКП), используемые в мировой практике, а также представлены результаты экспериментального определения показателя «Идентичность (подлинность)» на модельной клеточной линии. **Выводы:** методы оценки подлинности БМКП должны гарантировать однозначную идентификацию клеточной линии в соответствии с представленной спецификацией. В результате проведенных исследований отработана процедура экспертной оценки идентичности (подлинности) модельной клеточной линии.

Ключевые слова: биомедицинский клеточный продукт; идентичность (подлинность); экспертиза качества; клеточная линия

Для цитирования: Мельникова ЕВ, Рачинская ОА, Трусов ГА, Хорольский МД, Семенова ИС, Терешкина НВ, Меркулов ВА. Обоснование методических подходов к экспертной оценке подлинности биомедицинских клеточных продуктов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2019;19(1):28–38. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-28-38>

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

Justification of Methodological Approaches to Identification Testing of Biomedical Cell Products

E. V. Melnikova^{1,*}, O. A. Rachinskaya¹, G. A. Trusov¹, M. D. Khorolsky¹, I. S. Semenova¹,
N. V. Tereshkina¹, V. A. Merkulov^{1,2}

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

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

The manufacturer (developer) has to prepare a specification for each newly developed biomedical cell product (BCP) that has passed the stage of preclinical studies. The specification is included into the registration dossier when applying for marketing authorisation of a BCP. In accordance with the Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 14n of 19 January 2017 «On approval of the specification format for a biomedical cell product» the specification should contain information about authenticity of the cell line used in the BCP, namely:

morphological characteristics, expression of specific markers, expression of specific genes, expression of specific proteins, as well as markers of cell line stability. At present Russia has no practical experience in BCP quality evaluation. **The aim of the study** was to substantiate methodological approaches to authentication of cell lines used in BCPs as illustrated by quality evaluation of the DF-2 model cell line using test methods that allow for characterisation of the morphological, genetic, immunophenotypic, and cytogenetic profile of the cell line. **Materials and methods:** the study analysed the DF-2 cell line — human dermal fibroblasts (mesenchymal stem cells) obtained from the Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (St. Petersburg). The following analytical test methods were used in the study: morphological analysis; flow cytometry for immunophenotyping of the DF-2 model cell line; short tandem repeats for creating an allelic profile of the model cell line; cytogenetic analysis — differential DAPI staining of metaphase chromosomes. **Results:** the paper summarises methodological approaches to identification testing of medicines containing living human cells (BCP analogues) currently used in international practice, and presents the results of authentication of the model cell line. **Conclusions:** methods used for BCP identification testing should ensure unambiguous authentication of the cell line according to its specification. The study performed helped to work out the procedure of authentication of a model cell line.

Key words: biomedical cell product; identification; authentication; quality evaluation; cell line

For citation: Melnikova EV, Rachinskaya OA, Trusov GA, Khorolsky MD, Semenova IS, Tereshkina NV, Merkulov VA. Justification of methodological approaches to identification testing of biomedical cell products. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(1):28–38. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-28-38>

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

Одним из критических показателей качества препаратов для медицинского применения является подлинность, определяющая соответствие формулы, состава, химической и биологической структуры препарата, предназначенного для применения в клинической практике, препарату, для которого доказана эффективность и безопасность в ходе проведения доклинических и клинических исследований. Учитывая сложность состава биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) — наличие жизнеспособных клеток, которые могут при введении их реципиенту не только вызвать не требуемое вмешательство в систему его гомеостаза с развитием нежелательных реакций, но и создавать реальную угрозу здоровью человека инициированием опухолевого процесса — идентичность (подлинность) клеточного компонента БМКП играет важную роль в обеспечении гарантий применения безопасного препарата.

В Российской Федерации на сегодняшний день отсутствует опыт проведения экспертизы качества БМКП, однако мировой опыт оценки подлинности клеточных линий, входящих в состав препаратов клеточной терапии (аналогов БМКП), представлен достаточно широко. В настоящее время необходимо выделить следующие основные принципы определения подлинности клеточных линий (КЛ), принятые на мировом уровне.

В соответствии с монографией <1046> USP 41–NF 36¹ одним из трендов определения подлинности (аутентификации — выявления принадлежности конкретной клеточной линии конкретному человеку) клеточных линий, получивших распространение в последнее время, является использование технологии ДНК-фингерпринтинга, например анализа коротких tandemных повторов (short tandem repeat, STR), результаты которого должны содержаться в спецификации на готовый продукт на основе клеток и тканей человека.

Рабочей группой по биологическим лекарственным препаратам Европейского агентства по лекарственным средствам

было обращено внимание, что «на сегодняшний день использование проточной цитометрии считается недостаточным для доказательства подлинности препарата для клеточной терапии»². Например, могут быть использованы методы построения генного профиля, анализ экспрессии микро-РНК, которые контролируют экспрессию целых классов генов, анализ эпигенетического профиля, изучающего степень метилирования генных промоторов, методы ДНК-фингерпринтинга.

Согласно рекомендациям American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002 (2010), American National Standardization Institute (2012)³, эталоном анализа подлинности (аутентификации) КЛ является STR-анализ наряду с исследованием кариотипа. Ведущие мировые коллекции в спецификациях на КЛ человека указывают характеристику кариотипа и STR-профиль [1].

В соответствии с рекомендациями ВОЗ (WHO/BS/10.2132)⁴ и ICH Q5D⁵, при характеристике клеточных банков необходимо подтверждать подлинность и генетическую стабильность КЛ (диплоидных, в том числе стволовых клеток) следующими методами: методы анализа профиля ДНК STR, SNP (Single nucleotide polymorphism) и др.; методы, основанные на HLA-типировании (Human leucocyte antigens, HLA); изоферментный анализ; цитогенетические методы.

На каждый разработанный БМКП, прошедший доклиническое исследование, разработчиком или производителем БМКП составляется спецификация, представляющая собой документ, содержащий сведения о его типе (аутологичный, аллогенный, комбинированный), качественном и количественном составе, биологических и иных характеристиках клеточной линии (клеточных линий) и БМКП. Форма спецификации утверждена Приказом Министерства здравоохранения РФ от 19 января 2017 г. № 14н «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт». В соответствии

¹ USP 41–NF 36 <1046> Cellular and tissue-based products.

² SME Workshop on CMC of Biological Medicinal Products. EMA London 14–16.04.2015. CMC ISSUES for Cell Based ATMP. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Presentation/2015/05/WC500187353.pdf

³ American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002. Cell line misidentification: the beginning of the end. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(6):441–8. <https://doi.org/10.1038/nrc2852>

⁴ Expert committee on biological standardization. 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/BS/10.2132). WHO; 2010. https://www.who.int/biologicals/BS2132_CS_Recommendations_CLEAN_19_July_2010.pdf

⁵ ICH Topic Q 5 D Quality of Biotechnological Products: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products (CPMP/ICH/294/95). EMEA; 1998. https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-5-d-derivation-characterisation-cell-substrates-used-production-biotechnological/biological-products-step-5_en.pdf

Дермальные фибробласты человека в составе медицинского изделия «Эквивалент дермальный, ЭД»	
Разработчик: Институт цитологии РАН (Санкт-Петербург)	
Первое изделие медицинского назначения, в котором использовались клетки кожи человека (было получено регистрационное удостоверение, срок действия которого истек)	
Предназначено для лечения термических поражений, трофических язв и ран другой этиологии	
ЭД — гель из белков внеклеточного матрикса (коллагена I типа либо фибриногена) с дермальными фибробластами человека, заключенными внутри геля	
ЭД на основе коллагена (плотный и полужидкий) обеспечивает эффективное заживление всех типов ран. Плотный накладывается на неадгезивную повязку и переносится на раневую поверхность. Полужидкий вариант ЭД можно наносить на раневую поверхность из медицинского шприца без иглы	ЭД на основе фибриногена (менее плотный чем на основе коллагена) — для заживления неглубоких ран. У пациентов с аллергией коллаген может вызывать негативную реакцию, и в этих случаях целесообразнее применять ЭД на основе фибрина
В процессе применения в клинической практике к 2012 г. было вылечено более 450 пациентов с разнообразными повреждениями кожного покрова и другими ранами	

Рис. 1. Пример использования дермальных фибробластов в клинической практике [2, 7, 8].
Fig. 1. An example of using dermal fibroblasts in clinical practice [2, 7, 8].

со спецификацией определение «Идентичность (подлинность)» КЛ, входящей в состав БМКП, включает:

- морфологические характеристики (форма, размер, степень гетерогенности, особенности роста клеток и др.);
- экспрессию специфических маркеров (поверхностные маркеры: CD⁺, CD⁻);
- экспрессию специфических генов (при генетической модификации или дифференцировке; например для генетически модифицированных клеток должны быть указаны использованные генетические конструкции, особенности их состава, методы оценки стабильности, описание целевого гена, ответственного за терапевтический эффект);
- экспрессию специфических белков — собственные специфические белки или целевые белки, экспрессия которых обусловлена модификацией, связанной с терапевтическим действием БМКП (в том числе их количественное определение);
- маркеры стабильности клеточной линии (формула кариотипа, наличие структурных и численных хромосомных аномалий; «ДНК-отпечаток» КЛ: STR-профиль или однонуклеотидный полиморфизм (SNP-профиль КЛ). В данном случае под стабильностью КЛ подразумевается не классическое понятие стабильной (перевиваемой) КЛ, принятое в вирусологии, или стабильная экспрессия генно-инженерной конструкции, принятая в молекулярной биологии, а генетическая стабильность КЛ.

Таким образом, определение показателя «Идентичность (подлинность)» клеточного компонента зависит от происхождения КЛ и наличия модификации, при этом должен быть охарактеризован фенотипический и генотипический профиль клеток.

Кроме того, при обосновании стратегии контроля качества и состава спецификации необходимо учитывать сложность

стандартизации клеточного компонента БМКП (учитывая вариативность донорского материала) и отсутствие соответствующих референс-препаратов, поэтому спецификация должна содержать диапазон приемлемых значений подлинности КЛ, входящей в состав БМКП.

Целью данной работы является обоснование методических подходов к определению идентичности (подлинности) клеточных линий, входящих в состав БМКП, в рамках экспертизы качества на примере клеточной линии DF-2 при использовании методов, позволяющих характеризовать морфологический, генетический, иммунофенотипический и цитогенетический профиль КЛ.

В настоящее время в России отсутствуют зарегистрированные БМКП, а также БМКП, представленные на государственную регистрацию. Учитывая данный факт, для отработки методов оценки идентичности (подлинности) КЛ в рамках экспертизы качества БМКП была выбрана модельная КЛ DF-2, которая может представлять собой БМКП или входить в состав БМКП. Более того, к настоящему времени известны примеры успешного использования подобного типа КЛ в клинической практике [2–6], в том числе в рамках новых медицинских технологий (рис. 1) [2, 7, 8].

Материалы и методы

Материалы

Клеточная линия DF-2 — дермальные фибробласты человека (мезенхимные стволовые клетки) из кожи век 45-летнего донора — получена из Института цитологии РАН (Санкт-Петербург)⁶ на 8-м пассаже. КЛ имеет нормальный кариотип;

⁶ Российская коллекция клеточных культур позвоночных (РККК П). Институт цитологии РАН. http://www.cytspb.rssi.ru/rkkk/katalog_rccc_v_2018_rus.pdf

свободна от бактерий, микоплазм, грибов; экспрессирует поверхностные антигены, характерные для мезенхимных стволовых клеток (МСК): CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC; отсутствует экспрессия антигенов: CD34, CD45 и HLA-DR; КЛ способна к направленной дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях. Подробные характеристики и работа с КЛ описаны в работе Т.А. Крыловой с соавт. [9].

Методы

1. *Оценку подлинности* модельной КЛ проводили на 12-м пассаже. Однако необходимо обратить внимание, что при проведении экспертизы качества должны быть определены показатели качества КЛ, входящей в состав БМКП, на том пассаже, который используется для его производства.

2. *Культивирование* КЛ DF-2 осуществляли на среде DMEM/F-12 с NERES (Gibco, кат. № 31330-038) с содержанием 10 % FBS (HyClone, кат. № SH30070.03), в условиях 5,0 % CO₂ при 37 °С и влажности 90 % в течение 21 сут (на протяжении 4 пассажей). Плотность посева составляла 20·10³ клеток/см². Среднее время удвоения популяции составило 44,9 ± 5,2 ч. Жизнеспособность — 99 %.

3. *Морфологическое исследование* клеток проводили при окрашивании клеточных препаратов по стандартной методике красителем Азур-зозином (арт. 12000101, ООО «МиниМед», Россия) по Романовскому–Гимзе. Окрашенные препараты просматривали в световом микроскопе MICROS (Австрия) (при увеличении ×40, ×100, ×1000). Фотографирование клеток осуществляли встроенной цветной цифровой камерой высокого разрешения CAM V400/1.3M.

4. *Определение иммунофенотипа* КЛ проводили методом проточной цитометрии с использованием прибора NovoCyte 3000 (ACEA, Biosciences, Inc., США) по стандартному протоколу. Применяли моноклональные антитела (Sony Biotechnology, США) к антигенам человека для иммунофенотипирования FITC anti-human CD90 (Thy1) (№ 2240535), PE anti-human CD44 (кат. № 2294035), PE/Cy7 anti-human CD73 (Ecto-55'-nucleotidase) (кат. № 2320045), Alexa Fluor® 700 anti-human CD45 (кат. № 2120115), APC anti-human CD105 (кат. № 2216035), APC/Cy7 anti-human CD34 (кат. № 2317565), Brilliant Violet 421™ anti-human HLA-DR (кат. № 2138175).

Рабочая концентрация суспензий клеток составляла 1·10⁶ клеток/мл. Для оценки жизнеспособности использовали флуоресцентный маркер для ДНК 7-AAD Viability Staining Solution (кат. № 2702015, Sony Biotechnology, США).

Данные иммунофенотипического анализа обрабатывали с использованием программного обеспечения (NovoExpress 1.1.0) для проточной цитометрии. Оценивали 10000 событий. Клеточный дебрис был исключен путем гейтирования согласно сигналам светорассеяния. Мертвые клетки были исключены в соответствии с флуоресценцией 7-AAD. Спектральное перекрытие компенсировали с помощью одноцветных контролей.

5. *Построение аллельного профиля* модельной клеточной линии осуществляли методом коротких tandemных повторов с использованием двух наборов для определения STR-локусов: COrDIS Plus (арт. CP-192S, Gordiz, Россия) и AuthenticFiler™ PCR Amplification Kit (кат. № 4479566, Applied Biosystems, США) в соответствии с рекомендациями производителей. Выделение ДНК проводили при помощи набора PureLink gDNA (кат. № K182002, Invitrogen, США). Концентрацию ДНК определяли по оптической плотности раствора ДНК на приборе Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, США). Амплификацию проводили

с помощью прибора T100 (Bio-Rad, Сингапур). Для получения полного STR-профиля проводили фрагментный анализ — электрофоретическое разделение продуктов амплификации на приборе Genetic Analyzer 3500 Series (Applied Biosystems, Сингапур), результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения GeneMapper ID-X 1.4 (Applied Biosystems).

6. *Цитогенетическое исследование* проводили методом DAPI-дифференциального (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, DAPI) окрашивания метафазных хромосом. При приготовлении клеточной суспензии клетки выдерживали 20 мин в гипотоническом растворе 0,56 % KCl при температуре 37 °С, осаждали клетки центрифугированием при 180 г в течение 5 мин и фиксировали в смеси ледяной уксусной кислоты и метанола в соотношении 3:1 со сменой фиксатора через 20 мин. Фиксированную клеточную суспензию по каплям наносили на предварительно очищенные и обезжиренные предметные стекла в оптимально подобранных с помощью метафазного спредера Nanabi-PO (ADSTEK Corporation, Япония) условиях. Полученные хромосомные препараты окрашивали флуоресцентным красителем DAPI (Fluoroshield with DAPI, Sigma, США), нанося каплю красителя на препарат под покровное стекло. Анализ метафазных хромосомных пластинок осуществляли на флуоресцентном микроскопе BX43 (Olympus Corp., Япония) при увеличении ×200 и ×600. Фотографирование клеток осуществляли встроенной цветной цифровой камерой высокого разрешения BV 300 (ASI, Израиль). Полученные изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения для автоматизированных цитогенетических и морфологических исследований Band View System (ASI, Израиль).

Результаты и обсуждение

Требуемый профиль идентичности (подлинности) БМКП должен быть изученным и подтвержденным по цитогенетическим, молекулярно-биологическим, иммунохимическим, физико-химическим показателям КЛ, входящих в его состав. Методы, выбранные для подтверждения требуемого профиля качества, эффективности и безопасности, должны быть научно обоснованы, объективны и адекватны, информативны и стандартизованы.

В соответствии с требованиями спецификации⁷ к сведениям о КЛ, входящей в состав БМКП, основным принципом оценки идентичности (подлинности) клеточного компонента БМКП является использование совокупности методов, позволяющих осуществить характеристику морфологического, генетического, иммунофенотипического и цитогенетического профиля КЛ, входящей в состав БМКП.

Критерием приемлемости оценки подлинности КЛ является соответствие определенных в ходе экспертизы качества характеристик представленной спецификации. В соответствии с данным принципом нами была осуществлена оценка идентичности (подлинности) модельной КЛ, разработчицей которой показали стабильность ее свойств до 20 пассажа [9]. Необходимо отметить, что КЛ, используемая для производства, должна быть стандартизирована на этапе разработки и доклинических исследований БМКП, также должно быть установлено число пассажей, при которых показатели качества КЛ остаются приемлемыми. Например, для лечения трофических язв венозной этиологии использовали фибробласты, культивированные в течение 2–8 сут (до 3-го пассажа) [10]; при использовании аутологических фибробластов для коррекции возрастных изменений клетки культивировали 4–6 нед. (около 8–12 пассажей) [11].

⁷ Приказ Минздрава России от 19 января 2017 г. № 14н «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт».

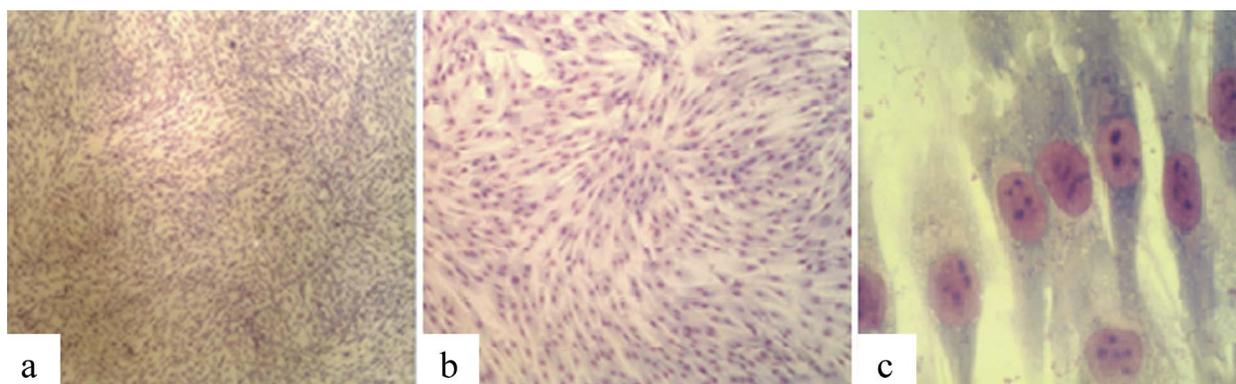


Рис. 2. Культура клеток DF-2. Окраска по Романовскому–Гимзе: а — увеличение $\times 40$; б — увеличение $\times 100$; с — увеличение $\times 1000$ (масляная иммерсия).

Fig. 2. The DF-2 cell culture. Romanovsky–Giemsa staining: а — $40\times$ magnification; б — $100\times$ magnification; с — $1000\times$ magnification (oil immersion).

Полученные данные по оценке идентичности (подлинности) модельной КЛ сравнивали с паспортом на КЛ, предоставленным Институтом цитологии РАН⁸.

Учитывая отсутствие на сегодняшний день общих фармакопейных статей для БМКП использованные методы при определении показателя «Идентичность (подлинность)» соответствуют требованиям фармакопей США⁹ и ЕС¹⁰.

Морфологический анализ

Морфологический анализ модельной клеточной линии DF-2 показал, что исследованная культура характеризуется низким уровнем гетерогенности. Большую часть клеток (до 90 %) составляют фибробластоподобные клетки с четко различимым, центрально расположенным ядром, ядрышками (от 2 до 7, преимущественно до 5), цитоплазмой с перинуклеарной зернистостью, четко выраженной поточностью роста и многочисленными завихрениями (рис. 2).

Результаты морфологического анализа соответствуют описанным в работе Т.А. Крыловой с соавт. [9] и паспорте свойствам клеточной линии.

Определение поверхностных маркеров

При определении показателя «Идентичность (подлинность)» клеточного компонента методом проточной цитометрии проводят иммунофенотипирование клеток, входящих в его состав, с помощью меченных флуорохромами моноклональных антител, специфичных к антигенам целевых клеток или другим важным для конкретного исследования маркерам¹¹. Пробоподготовка для исследования методом проточной цитометрии подлинности клеточного компонента БМКП, который представляет собой суспензию клеток, осуществляется по стандартной методике, однако пробоподготовка (получение суспензии клеток) при наличии в составе БМКП неклеточных компонентов, медицинского устройства, геля или других носителей (скаффолдов) может быть затруднена, а в некоторых случаях практически неосуществима без потери жизнеспособности клеток. Определение жизнеспособности клеток после отделения клеточного компонента от неклеточного является необходимой процедурой перед проведением анализа [12]. Таким образом, при проведении иммунофенотипирования кле-

ток, входящих в состав БМКП, методом проточной цитометрии в случае наличия в составе БМКП неклеточного компонента производителем для проведения экспертизы качества должна быть предоставлена методика отделения клеточного компонента от неклеточного.

При подтверждении фенотипа обеспечивают соблюдение следующих условий^{12,13} [13]:

- концентрация клеток в конечной суспензии должна быть определена по крайней мере трижды методикой, которая валидирована для данного типа клеток (подсчет в камере Горяева, при использовании гемоцитометра или счетчиков клеток);
- между взятиями аликвот на анализ рекомендуется тщательно суспендировать клетки для более точного определения; полученное усредненное значение концентрации клеток в суспензии должно соответствовать выбранной дозе клеток и выбранному объему введения;
- объем суспензии для анализа должен превышать рассчитанный объем, необходимый для введения в прибор, в соответствии с рекомендациями производителей приборов (для компенсации потерь препарата на этапе введения в прибор, связанных с «мертвым» объемом шприцев и другими потерями);
- суспензия должна быть стерильной;
- суспензия не должна содержать примесей, информации о которых нет в регламенте подготовки клеток к введению. Наилучшим реагентом для разведения клеток является физиологический раствор или фосфатно-солевой буфер; от примесей питательной среды рекомендуется избавиться путем трехкратного переосаждения клеток;
- поскольку затруднительно точно определить период от подготовки образца (например, суспензии клеток после оттаивания) до его введения пациенту, то не рекомендуется хранить конечную суспензию клеток для анализа дольше, чем срок хранения до предполагаемого использования. По этой причине проводить тестирование продукта следует в течение периода не большего, чем время ожидания до инокуляции (например, 2 ч), в том числе для того, чтобы гарантировать правильную дозу клеток, вводимую пациенту.

В результате анализа иммунофенотипа модельной КЛ показано (табл. 1), что полученная из Института цитологии РАН

⁸ Паспорт коллекционной клеточной линии DF-2.

⁹ USP 41–NF 36 <1046> Cellular and tissue-based products.

¹⁰ European Pharmacopoeia 9th Ed.

¹¹ USP 41–NF 36 <1027> Flow Cytometry.

¹² 2.7.24. Flow cytometry. European Pharmacopoeia 9th Edition.

¹³ USP 41–NF 36 <1027> Flow Cytometry.

Таблица 1. Сравнение доли клеток, экспрессирующих поверхностные антигены в модельной клеточной линии DF-2, с данными литературы

Table 1. Comparison of the proportion of cells expressing surface antigens in the model DF-2 culture with literature data

Маркер	Доля клеток, несущих маркер, %	
	DF-2	DF-2 [9]
CD44	99,63 ± 0,15	99,5 ± 0,3
CD73	99,73 ± 0,1	99,4 ± 0,2
CD90	99,76 ± 0,06	99,4 ± 0,04
CD105	98,22 ± 1,24	95,4 ± 3,0
CD34	3,62 ± 0,99	0,07 ± 0,05
CD45	0,23 ± 0,07	0,32 ± 0,15
HLA-DR	0,2 ± 0,08	0,07 ± 0,03

Примечание. Даны средние значения и их ошибки доли клеток (несущих маркер) из 3 экспериментов.

КЛ DF-2 соответствует паспорту по характеру и уровню экспрессии исследованных поверхностных антигенов — CD90, CD73, CD105, CD44, что свидетельствует о том, что культура DF-2 человека представляет собой популяцию МСК.

Известно, что фибробласты отвечают большинству предложенных минимальных критериев идентификации МСК и одним из критериев, используемых для определения МСК, является отсутствие экспрессии CD34, CD45 и HLA-DR по меньшей мере в 98 % клеток [14].

Отличие в результатах экспрессии маркеров CD34, CD45 и HLA-DR по сравнению с данными паспорта клеточной линии свидетельствует о гетерогенности популяции модельной КЛ, что с высокой долей вероятности объясняется дифференцировкой некоторого количества клеток КЛ.

Необходимо также обратить внимание, что в настоящей статье была проанализирована модельная КЛ, которая не предназначена для производства БМКП. Для определения диапазона соответствия анализируемых параметров необходимо проведение валидационных мероприятий.

Определение маркеров стабильности клеточной линии

STR-анализ — автоматизированный метод, позволяющий достаточно быстро аутентифицировать клеточную линию человека и получить результаты в формате, подходящем для сравнения со стандартной референсной базой данных, паспортом, спецификацией или STR-профилем, полученным на основе клинического материала (например, крови) донора. STR-анализ не может выявить контаминацию клетками других биологических видов, для выявления которой рекомендуется использовать метод ПЦР с видоспецифичными праймерами [15].

Рабочей группой SDO ATCC (ASN-0002) и Международным комитетом по идентификации клеточных линий ICLAC для наглядного сравнения родственных клеточных линий (клеточной линии и донорского материала) рекомендованы восемь из наиболее информативных полиморфных маркеров в геноме человека (D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, vWA, TH01, TPOX, CSF1PO) и ген амелогенина (принадлежность к полу) [1].

Учет результатов STR-анализа основан на алгоритме, предусматривающем определение числа общих аллелей между двумя клеточными линиями / между исходной клеточной

линией и линией, входящей в состав БМКП / между донорским материалом и клеточной линией, входящей в состав БМКП, выраженного в процентах. Оценку результатов проводят с использованием программного обеспечения к генетическому анализатору.

При необходимости производителем могут быть выбраны другие аналогичные методы (например, SNP-анализ [16]) или дано обоснование невозможности/нецелесообразности проведения метода определения STR-профиля КЛ при оценке показателя «Идентичность (подлинность)». Производитель вправе также рекомендовать использование любого из существующих наборов STR-анализа при условии доказательства целесообразности их использования и валидации методики.

Для оценки возможности использования метода STR-анализа для аутентификации КЛ человека, входящих в состав БМКП, в рамках экспертизы качества при определении показателя «Идентичность (подлинность)» нами была проведена аутентификация модельной КЛ. По итогу проведенных исследований были созданы STR-профили исследуемой модельной КЛ DF-2, которые сравнивали с данными паспорта (рис. 3, 4).

Полученные STR-профили клеточной линии DF-2 доказывают ее полное совпадение с представленным паспортом и происхождение от донора женского пола. В таблице 2 представлены данные, характеризующие совпадение аллелей в одинаковых локусах клеточных линий, определенные разными наборами, а также их соответствие паспорту.

При определении маркеров стабильности КЛ цитогенетическими методами могут быть использованы как методы, основанные на анализе метафазных хромосом (табл. 3)¹⁴ [17], так и методы, основанные на анализе интерфазных ядер и ДНК клеток — в случае невозможности получения достаточного количества клеток на стадии митоза (табл. 4) [18–20]. Для уточнения полученных результатов в некоторых случаях может возникнуть необходимость в применении нескольких цитогенетических методов.

Таблица 2. Данные экспериментально полученных STR-профилей и паспорта клеточной линии DF-2

Table 2. Data of experimentally obtained STR-profiles and passport of DF-2 cell line

Данные паспорта	Данные STR-профилей, определенные набором...	
	AuthentiFiler PCR Amplification Kit	COrDIS plus
Amelogenin: X, X CSF1PO: 10, 12 D13S317: 11, 11 D16S539: 11, 11 D5S818: 11, 13 D7S820: 13, 13 TH01: 6, 9 TPOX: 9, 9 vWA: 15, 17	Amelogenin: X, X D10S1248: 14 D1S1656: 12, 18.3 D2S1338: 17, 24 D22S1045: 15, 17 D19S433: 14, 16 TH01: 6, 9 D2S441: 10, 14 D6S1043: 12, 14 D12S391: 16, 19	Amelogenin: X, X D10S1248: 14, 14 D1S1656: 12, 18.3 D3S1358: 15, 18 D22S1045: 15, 17 D7S820: 13, 13 TH01: 6, 9 D2S441: 10, 14 D12S391: 16, 19 D13S317: 11, 11 FGA: 20.2, 25.2 TPOX: 9, 9 D18S51: 11, 16 D16S539: 11, 11 D8S1179: 12, 12 CSF1PO: 10, 12 D5S818: 11, 13 vWA: 15, 17 D21S11: 28, 30 SE33: 21, 28.2

¹⁴ Рубцов НБ. Методы работы с хромосомами млекопитающих: учебное пособие. Новосибирск: Новосибирский гос. ун-т; 2006.

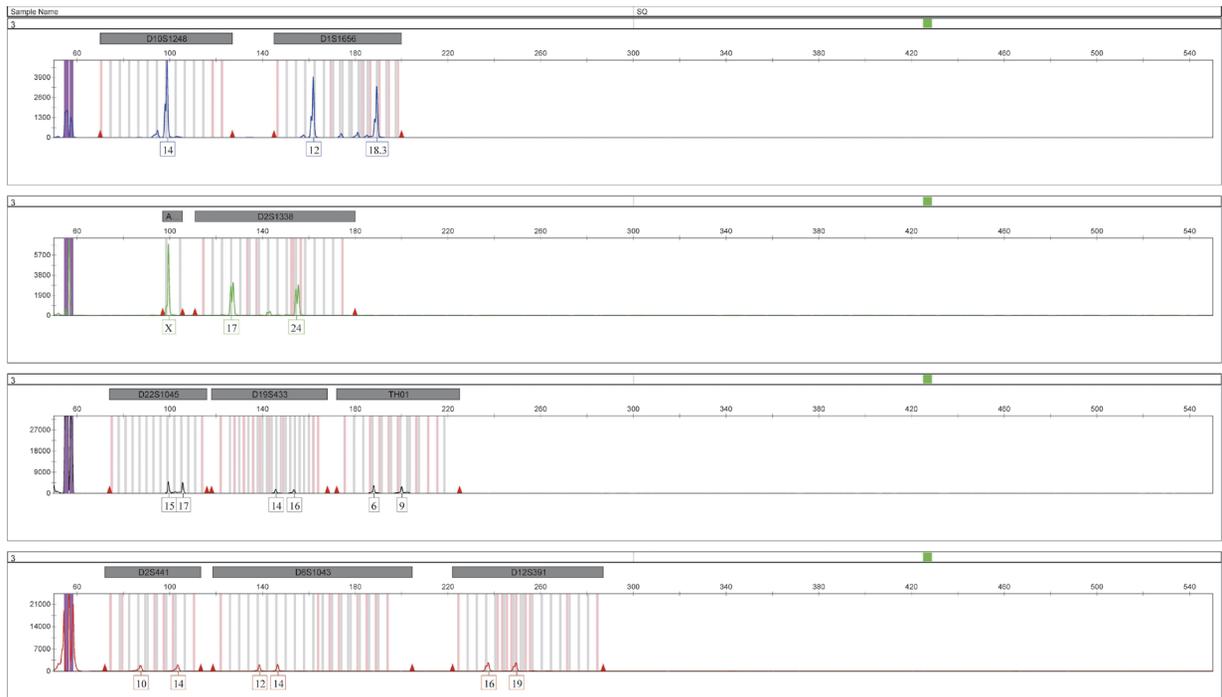


Рис. 3. STR-профиль клеточной линии DF-2, полученный при амплификации набором AuthenticFiler PCR Amplification Kit.
Fig. 3. The STR-profile of the DF-2 cell line obtained by amplification using the AuthenticFiler PCR Amplification Kit.

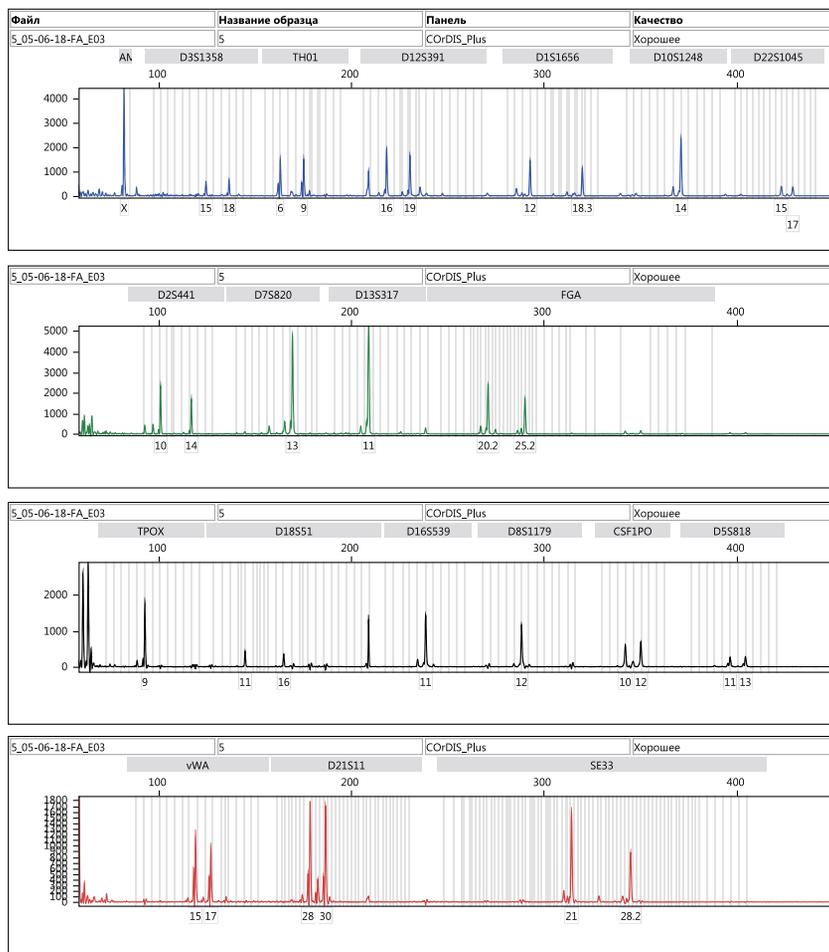


Рис. 4. STR-профиль клеточной линии DF-2, полученный при амплификации набором COrDIS plus.
Fig. 4. The STR-profile of the DF-2 cell line obtained by amplification using the COrDIS plus kit.

Таблица 3. Методы, основанные на анализе метафазных хромосом
Table 3. Methods based on the analysis of metaphase chromosomes

Метод	Возможности методов	Ограничения методов	Требование к материалу
Дифференциальное окрашивание, в том числе окрашивание хромосом красителем Гимзы и флуоресцентными красителями	Гендерная принадлежность клеток. Хромосомные перестройки, размером превышающие 10 млн п.н.: - инверсии; - дупликации/делеции; - сбалансированные и несбалансированные транслокации; - анеуплоидии. Клональный мозаицизм	Хромосомные перестройки, не превышающие 10 млн п.н.	Клеточный материал должен обладать достаточным количеством клеток на стадии митоза. Культивирование перед отбором материала должно осуществляться по требованиям методик анализа с возможным применением цитостатирующих и интеркалирующих хромосомы веществ. Таким образом, клеточная линия должна быть представлена в состоянии, гарантирующем сохранение заявленных в паспорте свойств клеток и обеспечивающем возможность проведения цитогенетического анализа
Спектральное кариотипирование (SKY) и многоцветная FISH (M-FISH)	Гендерная принадлежность клеток. Хромосомные перестройки, менее 10 млн п.н.: - сбалансированные и несбалансированные транслокации; - анеуплоидии. Клональный мозаицизм	Внутрихромосомные перестройки	

Таблица 4. Методы, основанные на анализе интерфазных ядер и ДНК клеток
Table 4. Methods based on the analysis of interphase nuclei and DNA of cells

Метод	Возможности методов	Ограничения методов	Требование к материалу
Метафазная сравнительная геномная гибридизация (CGH) и матричная сравнительная геномная гибридизация (array-CGH)	Гендерная принадлежность клеток. Геномные изменения менее 10 млн. п.н.: - изменение числа копий; - дупликации/делеции; - несбалансированные транслокации; - анеуплоидии. Клональный мозаицизм более 10 %	Сбалансированные транслокации. Инверсии. Клональный мозаицизм менее 10 %	Количество клеточного материала, прописанное в инструкции к реактивам для выделения ДНК
Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> (FISH) на ядрах	Гендерная принадлежность клеток (при использовании зондов, специфичных к половым хромосомам). Численные и, возможно, структурные изменения районов хромосом, к которым выбраны локус-специфичные зонды	Перестройки районов хромосом, для которых не использовались локус-специфичные зонды	От 1·10 ⁶ клеток клеточной линии в состоянии, гарантирующем сохранение заявленных в паспорте свойств клеток и обеспечивающем возможность проведения анализа
Микроядерный тест	Ацентрические фрагменты хромосом. Отстающие хромосомы	Гендерная принадлежность клеток. Численные хромосомные аномалии. Структурные хромосомные аномалии без образования ацентрических фрагментов хромосом	От 1·10 ⁶ клеток клеточной линии в состоянии, гарантирующем сохранение заявленных в паспорте свойств клеток и обеспечивающем возможность проведения анализа

В процессе цитогенетического анализа модельной КЛ DF-2 общее число хромосом было посчитано в 540 клетках. Установлено, что около 2 % клеток обладают тетраплоидным кариотипом. Более 98 % клеток содержат околодиплоидный набор хромосом (45–46 хромосом). Такое процентное соотношение диплоидных и полиплоидных клеток не превышает значений (3–5 %), свойственных для тканей здорового человека.

Кариотипирование 17 метафазных пластинок выявило женский набор половых хромосом (45,XX или 46,XX) во всех исследованных клетках, что соответствует паспортным данным КЛ, полученной от донора женского пола [9].

Нормальный кариотип (46,XX) несут 53 % клеток — модальный класс (рис. 5). Формула кариотипа человека — основная характеристика, определяющая статус линий клеток¹⁵. 47 % клеток исследованной клеточной линии обладают различными численными и/или структурными хромосомными аномалиями (рис. 5).

Подобная высокая варибельность клеток по числу хромосом и наличие межклеточной гетерогенности указывают на наличие генетической нестабильности у клеток исследуемой линии [21]. Генетическая нестабильность в клетках линии DF-2, возможно, свидетельствует о начальных стадиях старения этой клеточной линии [22].

Все выявленные в результате исследования хромосомные аномалии (анеуплоидии, внутрихромосомные перестройки, однохроматидные разрывы) носят неклональный характер, т.е. встречаются всего в одном из проанализированных кариотипов.

В большинстве цитогенетических лабораторий на данный момент принято при стандартном анализе исследовать 11 или более клеток для исключения мозаицизма более 25 % [20]. Число исследованных в настоящей работе клеток позволяет с достоверной вероятностью 95 % исключить наличие клона, составляющего более 17 % популяции клеток. Анализ большего числа метафазных пластинок в рамках проведения экспертизы

¹⁵ Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M, eds. ISCN (2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: S. Karger; 2013.

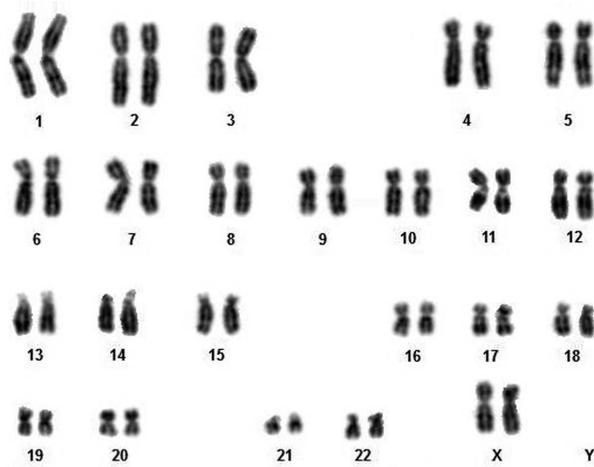


Рис. 5. Кариотип клеток линии DF-2 с модальным классом хромосом.
Fig. 5. The DF-2 cell line karyotype with a modal class of chromosomes.

качества БМКП потребует большего количества клеточного материала и времени, что не всегда возможно получить в связи с ограниченным объемом и сроком годности БМКП. Таким образом, более полный цитогенетический анализ в целях подтверждения стабильности генома клеточной линии целесообразнее проводить на этапе доклинических исследований.

Выводы

Методы оценки подлинности БМКП должны гарантировать однозначную идентификацию клеточной линии в соответствии с представленной спецификацией. В результате проведенных исследований отработана процедура экспертной оценки идентичности (подлинности) модельной КЛ.

Приемлемость использования той или иной КЛ для производства БМКП обосновывается разработчиком по результатам оценки качественных характеристик (идентичности (подлинности) КЛ, стерильности, бактериальных эндотоксинов, инфекционной безопасности, активности), стабильности их сохранения в процессе производства, а также проведения доклинических исследований БМКП.

На основании проведенных испытаний клеточного компонента БМКП по показателю «Идентичность (подлинность)» в нормативной документации (спецификации) рекомендуется внести следующие сведения о КЛ:

- форма, размер, степень гетерогенности, особенности строения и роста клеток;
- STR-профиль КЛ;
- видовая принадлежность клеток;
- гендерная принадлежность клеток;
- процентное содержание клеток с увеличенной плоидностью;
- процентное содержание и формула кариотипа клеток с модальным классом хромосом;
- процентное содержание клонов с кариотипом, отличным от клеток модального класса, или процентное содержание клеток с неклональными перестройками (если применимо). В случае наличия клеток с хромосомными аномалиями (особенно носящими клональный характер) производитель должен обосновать приемлемость использования данной клеточной линии при производстве препарата на ее основе;
- перечень и уровень экспрессии специфических генов (при генетической модификации или дифференцировке);

- перечень и уровень экспрессии специфических белков (собственных или белков, экспрессия которых обусловлена модификацией).

Учитывая сложность стандартизации клеточного компонента БМКП и отсутствие референс-препаратов, спецификация на БМКП должна содержать диапазон приемлемых значений, в том числе по показателю «Идентичность (подлинность)».

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 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. 056-00154-19-00 and was supported by the FSBI «SCE-EMP» 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. Masters JR, Reid YA. Cell line authentication and characterization. *eLS*. 2014. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002559.pub2>.
2. Пинаев ГП. Необходимость соответствия нормативно-правового регулирования реальному процессу создания и применения биомедицинских клеточных технологий. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2012;8(3):61–4. [Pinaev GP. Compliance with regulatory actual process of creation and application of biomedical cell technologies. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-himicheskoy biologii im. Yu.A. Ovchinnikova* = *Yu.A. Ovchinnikov bulletin of biotechnology and physical and chemical biology*. 2012;8(3):61–4 (In Russ.)]
3. Гилевич ИВ, Федоренко ТВ, Коломийцева ЕА, Богданов СБ, Поляков ИС, Порханов ВА. Опыт совершенствования оказания помощи ожоговым пациентам в Краснодарском крае. В кн.: *Сборник материалов всероссийской конференции с международным участием «StemCellBio-2018: фундаментальная наука как основа клеточных технологий»*, 15–17 ноября 2018 г., г. Санкт-Петербург. С. 21. [Gilevich IV, Fedorenko TV, Kolomyitseva EA, Bogdanov SB, Polyakov IS, Porhanov VA. Experience in improving the care of burn patients in the Krasnodar region. In: *Materials of the all-Russian conference with international participation «StemCellBio-2018: fundamental science as the basis of cellular technologies»*, November 15–17, 2018, St. Petersburg. P. 21 (In Russ.)]
4. Ионов ПМ, Юркевич ЮВ, Дейнега ИВ, Беседина НК, Багаева ВВ. Перспективы эндоскопического лечения бронхиальных свищей введением *in situ* культивированных аллофибробластов. В кн.: *Сборник материалов всероссийской конференции с международным участием «StemCellBio-2018: фундаментальная наука как основа клеточных технологий»*, 15–17 ноября 2018 г., г. Санкт-Петербург. С. 45–6. [Ionov PM, Yurkevich YuV, Deynega IV, Besedina NK, Bagaeva VV. Prospects for endoscopic treatment of bronchial fistulas by the injection of *in situ* cultivated alloblasts. In: *Materials of the all-Russian conference with international participation «StemCellBio-2018: fundamental science as the basis of cellular technologies»*, November 15–17, 2018, St. Petersburg. P. 45–6 (In Russ.)]
5. Алейник ДЯ, Арефьев ИЮ, Докукина ЛН, Чарыкова ИН, Соловьев РА, Стручков АА, Сидорова ТИ. Опыт использования культивированных фибробластов в комбусти-

- ологии (по данным Нижегородского ожогового центра). В кн.: *Сборник материалов всероссийской конференции с международным участием «StemCellBio-2018: фундаментальная наука как основа клеточных технологий»*, 15–17 ноября 2018 г., г. Санкт-Петербург. С. 9. [Aleyunik DY, Arefiev IU, Dokukina LN, Charykova IN, Solovyov RA, Struchkov AA, Sidorova TI. Experience in the use of cultured fibroblasts in combustiology (according to the Nizhny Novgorod burn center). In: *Materials of the all-Russian conference with international participation «StemCellBio-2018: fundamental science as the basis of cellular technologies»*, November 15–17, 2018, St. Petersburg. P. 9 (In Russ.)]
- Вагнер ДО, Зиновьев ЕВ, Солошенко ВВ, Крылов ПК, Костяков ДВ, Юркевич ЮВ и др. Применение аллогенных фибробластов в комплексном лечении пациентов с обширными ожогами. В кн.: *Сборник материалов всероссийской конференции с международным участием «StemCellBio-2018: фундаментальная наука как основа клеточных технологий»*, 15–17 ноября 2018 г., г. Санкт-Петербург. С. 20. [Vagner DO, Zinoviev EV, Soloshenko VV, Krylov PK, Kostyakov DV, Yurkevich YuV, et al. The use of allergenic fibroblasts in the complex treatment of patients with extensive burns. In: *Materials of the all-Russian conference with international participation «StemCellBio-2018: fundamental science as the basis of cellular technologies»*, November 15–17, 2018, St. Petersburg. P. 20 (In Russ.)]
 - Блинова МИ, Юдинцева НМ, Александрова ОИ, Баллюзек МФ, Хабарова ИГ, Маркин СМ, Чагунава ОЛ. Клинический опыт заживления трофических язв с использованием клеточного продукта «Эквивалент дермальный ЭД». *Здоровье — основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения*. 2015;10(2):690–4. [Blinova IM, Udintsev NM, Aleksandrova OI, Ballyuzek MF, Khabarova IG, Markin SM, Chagunava OL. Clinical experience healing of venous ulcers with the use of a cellular product «The dermal equivalent ED». *Zdorove — osnova chelovecheskogo potentsiala: problemy i puti ikh resheniya = Health is the basis of human potential: problems and their solutions*. 2015;10(2):690–4 (In Russ.)]
 - Блинова МИ, Никольский НН, Михайлова НА. 25-летний опыт применения дермального эквивалента: итоги и перспективы. В кн.: *2-й Национальный Конгресс по регенеративной медицине. Материалы Конгресса*. 3–5 декабря 2015 года, Москва. М.: «МЕДИ Экспо»; 2015. С. 33–4. [Blinova MI, Nikol'skiy NN, Mikhailova NA. 25 years experience in the use of dermal equivalent: results and prospects. In: *II National Congress on Regenerative Medicine. Materials of the Congress*. December 3–5, 2015, Moscow. Moscow: «MEDI Ekspo»; 2015. P. 33–4 (In Russ.)]
 - Крылова ТА, Мусорина АС, Зенин ВВ, Кольцова АМ, Кропачева ИВ, Турилова ВИ и др. Получение и характеристика неиммортизированных клеточных линий дермальных фибробластов человека, выделенных из кожи век взрослых доноров разного возраста. *Цитология*. 2016;58(11):850–64. [Krylova TA, Musorina AS, Zenin VV, Koltsova AM, Kropacheva IV, Turilova VI, et al. Derivation and characteristic of a non-immortalized cell lines of human dermal fibroblasts, generated from skin of the eyelids of adult donors of different age. *Tsitologiya = Cytology*. 2016;58(11):850–64 (In Russ.)]
 - Мельцова АЖ, Гриценко ВВ, Орловский ПИ, Томсон ВВ, Сабельников ВВ, Шулепова ЕК и др. Применение дермальных фибробластов в комплексном лечении больных с трофическими язвами венозной этиологии. *Вестник хирургии им. И.И. Грекова*. 2007;166(1):72–7. [Meltsova AZh, Gritsenko VV, Orlovsky PI, Thomson VV, Sabelnikov VV, Shulepova EK, et al. Application of dermal fibroblasts in complex treatment of patients with trophic ulcers of venous etiology. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova = Vestnik khirurgii named after I.I. Grekov*. 2007;166(1):72–7 (In Russ.)]
 - Зорин В, Зорина А, Черкасов В, Копнин П, Деев Р, Исаев А и др. Применение аутологичных дермальных фибробластов для коррекции возрастных изменений кожи лица. Результаты годичных исследований. *Эстетическая медицина*. 2012;XI(2):171–82. [Zorin V, Zorina A, Cherkasov V, Kopnin P, Deev R, Isaev A, et al. The use of autologous dermal fibroblasts for correction of age changes of skin. The results of annual studies. *Esteticheskaya medicina = Aesthetic medicine*. 2012;XI(2):171–82 (In Russ.)]
 - Трусов ГА, Чапленко АА, Семенова ИС, Мельникова ЕВ, Олефир ЮВ. Применение проточной цитометрии для оценки качества биомедицинских клеточных продуктов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(1):16–24. [Trusov GA, Chaplenko AA, Semenova IS, Melnikova EV, Olefir YuV. Use of flow cytometry for quality evaluation of biomedical cell products. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(1):16–24 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-1-16-24>
 - Ткачук ВА, ред. *Методические рекомендации по проведению доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов*. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова; 2017. [Tkachuk VA, ed. *Methodical recommendations for conducting preclinical studies of biomedical cellular products*. Moscow: Lomonosov Moscow State University; 2017 (In Russ.)]
 - Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymalstromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
 - Barallon R, Bauer SR, Butler J, Capes-Davis A, Dirks WG, Elmore E, et al. Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2010;46(9):727–32. <https://doi.org/10.1007/s11626-010-9333-z>
 - Мельникова ЕВ, Меркулова ОВ, Меркулов ВА, Олефир ЮВ, Ручко СВ, Бокованов ВЕ. Идентификация клеточных линий человека с использованием метода генотипирования короткими tandemными повторами: мировая практика. *Биофармацевтический журнал*. 2015;7(6):3–10. [Melnikova EV, Merkulova OV, Merkulov VA, Olefir YuV, Ruchko SV, Bokovanov VE. Human cell line identification by typing of short tandem repeats: world practice. *Biofarmaceuticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2015;7(6):3–10 (In Russ.)]
 - Sumner AT. Chromosome banding and identification absorption staining. In: Gosden JR, ed. *Chromosome Analysis Protocols. Methods in Molecular Biology™*. Vol. 29. Totowa: Humana Press; 1994. P. 59–81. <https://doi.org/10.1385/0-89603-289-2:59>
 - Полиорганный микроядерный тест в эколого-гигиенических исследованиях. Монография. Рахманин ЮА, Сычева ЛП, ред. М.: Гениус; 2007. [Multi-organ micro-nuclear test in ecological and hygienic research. Monograph. Rahmanin YuA, Sycheva LP, eds. Moscow: Genius; 2007 (In Russ.)]
 - Theisen A. Microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH). *Nature Education*. 2008;1(1):45.
 - Гинтер ЕК, Золотухина ТВ, Антоненко ВГ, Шилова НВ, Цветкова ТГ, Жулева ЛЮ. *Цитогенетические методы диагностики хромосомных болезней. Методическое пособие для врачей*. М.; 2009. [Ginter EK, Zolotukhina TV, Antonenko VG, Shilova NV, Tsvetkova TG, Zhuleva LYu. *Cytogenetic methods of diagnosis of chromosomal diseases. Methodical manual for doctors*. Moscow; 2009 (In Russ.)]
 - Мамаева СЕ. Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре. *Цитология*. 1996;38(8):787–814. [Mamaeva SE. The patterns of the karyotypic evolution of cells in culture. *Tsitologiya = Cytology*. 1996;38(8):787–814 (In Russ.)]
 - Moskalev AA, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, Yanai H, Fraifeld VE. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev*. 2013;12(2):661–84. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.02.001>

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>

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

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>

Хорольский Михаил Дмитриевич, старший лаборант лаборатории биомедицинских клеточных продуктов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8222-0805>

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>

Терешкина Наталья Васильевна, канд. мед. наук, эксперт 1 категории управления экспертизы безопасности лекарственных средств Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6932-4965>

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, профессор, заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России; профессор кафедры фармакологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Поступила 20.12.2018
После доработки 10.02.2019
Принята к публикации 14.02.2019

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 Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-9585-3545>

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 Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8377-9205>

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 Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-8922-6342>

Mikhail D. Khorolsky, Major Laboratorian of the Laboratory of Biomedical Cell Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8222-0805>

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 Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-9026-0508>

Nataliya V. Tereshkina, Candidate of Medical Sciences, 1st Professional Category Expert of the Division for Evaluation of Medicinal Products' Safety of the Center for Examination and Control of Finished Drugs of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6932-4965>

Vadim A. Merkulov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Deputy General Director for Medicinal Products Evaluation of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products; Professor of the Department of Pharmacology of I. M. Sechenov First MSMU, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Received 20 December 2018
Revised 10 February 2019
Accepted 14 February 2019

Физико-химические и биологические свойства биоподобного и референтного препаратов тканевого активатора плазминогена

В. Д. Гусарова, М. С. Пантюшенко, В. М. Симонов, Р. Р. Шукуров, Р. А. Хамитов, А. Ю. Вишнеvский*

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

Рекомбинантный тканевой активатор плазминогена (международное непатентованное название — алтеплаза), разработанный и зарегистрированный компанией АО «ГЕНЕРИУМ» (Россия), является полным аналогом лекарственного препарата Актилизе®, используемого для лечения заболеваний, сопровождающихся тромбообразованием, таких как инфаркт миокарда, тромбоэмболия легочной артерии и ишемический инсульт. **Цель работы:** провести комплексное исследование сопоставимости физико-химических и биологических характеристик лекарственного препарата Ревелиза® и референтного препарата Актилизе® для оценки их биоподобия. **Материалы и методы:** сравнительное пептидное картирование с определением сопоставимости хроматографических профилей триптических гидролизатов проводилось методами ОФ-ВЭЖХ и масс-спектрометрии, определение молекулярно-массового распределения — методами масс-спектрометрии и электрофореза в полиакриламидном геле по Леммли. Для определения чистоты и гомогенности препаратов, а также содержания родственных примесей (олигомеров, фрагментов) использовали метод гель-фильтрации; исследование профиля N-гликозилирования осуществляли методом гидрофильной ВЭЖХ, определение тотального содержания сиаловых кислот — методом Свеннерхольма. Оценку связывания белка с фибрином и фибриногеном человека проводили методом поверхностного плазмонного резонанса, сравнение специфической активности — методом лизиса фибринового сгустка. **Результаты:** в ходе исследований было продемонстрировано полное совпадение пептидных карт анализируемых препаратов, что свидетельствует об идентичности аминокислотной последовательности алтеплазы в составе сравниваемых препаратов. Также сравнительно были определены молекулярная масса и содержание интактной одноцепочечной формы белка в лекарственных препаратах, количественно охарактеризованы посттрансляционные модификации, содержание сиаловых кислот и нейтральных сахаров. При изучении профиля N-гликозилирования обнаружены незначительные различия в процентном содержании мультиантенных комплексных гликанов. Специфичность алтеплазы оценивали при образовании белковых комплексов с природными лигандами алтеплазы — фибрином и ингибитором активатора плазминогена первого типа, при этом достоверных различий обнаружено не было. При сравнении специфической активации фибринолитической активности плазминогена в тесте на скорость лизиса фибринового сгустка была продемонстрирована сопоставимость препаратов Ревелиза® и Актилизе®. **Выводы:** проведенные сравнительные экспериментальные исследования показали отсутствие различий в структуре, гетерогенности распределения зарядов, содержании примесей, а также специфической активности алтеплазы в составе лекарственного препарата Ревелиза® и референтного препарата Актилизе®, что позволяет сделать вывод о сопоставимости препаратов по физико-химическим и биологическим свойствам.

Ключевые слова: тканевый активатор плазминогена; биоаналог; Актилизе®; Ревелиза®; профиль гликозилирования; посттрансляционные модификации; лизис фибринового сгустка

Для цитирования: Гусарова ВД, Пантюшенко МС, Симонов ВМ, Шукуров РР, Хамитов РА, Вишнеvский АЮ. Физико-химические и биологические свойства биоподобного и референтного препаратов тканевого активатора плазминогена. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2019;19(1):39–49. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-39-49>

***Контактное лицо:** Вишнеvский Александр Юрьевич; vishnevskiy@ibcgenerium.ru

Physico-Chemical and Biological Properties of Biosimilar and Reference Tissue Plasminogen Activator Products

V. D. Gusarova, M. S. Pantyushenko, V. M. Simonov, R. R. Shukurov, R. A. Khamitov, A. Yu. Vishnevskiy*

International Biotechnology Center «GENERIUM»,
14 Vladimirskaia St., Volginsky town, Petushinsky District,
Vladimir Oblast 601125, Russian Federation

Recombinant tissue plasminogen activator (international nonproprietary name — alteplase) which was developed by «GENERIUM» (Russia) and received a marketing authorisation in Russia is completely analogous to Actilyse® which is used to treat medical conditions accompanied by thrombosis, such as acute myocardial infarction, pulmonary embolism, and ischemic stroke. **The aim of the study** was to carry out a comprehensive comparison of physico-chemical and biological properties of Revelyse® and the reference product Actilyse® in order to assess their biosimilarity. **Materials and Methods:** comparative peptide mapping and determination

of comparability of chromatographic profiles of tryptic hydrolysates was performed using RP-HPLC and mass-spectrometry; the molecular weight distribution was determined by mass-spectrometry and polyacrylamide gel electrophoresis (Laemmli method). The purity and homogeneity of products as well as the content of related impurities (oligomers and fragments) were determined using gel filtration; N-glycosylation profile was analysed by hydrophilic HPLC, total sialic acid was quantified by the Svennerholm resorcinol method. Protein binding to fibrin and human fibrinogen was assessed by surface plasmon resonance, and the specific activity was compared by fibrin clot lysis. **Results:** the research demonstrated a complete overlap of the products' peptide maps, which indicates the identity of alteplase amino acid sequences in the two medicines being compared. The authors of the study also determined the molecular weight and the content of the intact single-stranded form of the protein, and quantified post-translational modifications, the content of sialic acids and neutral sugars. The analysis of the N-glycosylation profile revealed insignificant differences in the percentage of multi-antenna complex glycans. The specificity of alteplase was evaluated by analysing the formation of protein complexes with natural alteplase ligands – fibrin and plasminogen activator inhibitor-1, but no significant differences were found. The comparison of specific activation of plasminogen fibrinolytic activity was performed based on the results of the assay analysing the fibrin clot lysis rate, and it demonstrated comparability of Revelyse® and Actilyse®. **Conclusions:** comparative experimental studies have shown no differences in the structure, charge distribution heterogeneity, impurities content, and specific activity of alteplase as a component of Revelyse® and the reference product Actilyse®, which leads to the conclusion that they are similar in terms of physico-chemical and biological properties.

Key words: tissue plasminogen activator; biosimilar; Actilyse®; Revelyse®; glycosylation profile; post-translational modifications; fibrin clot lysis

For citation: Gusarova VD, Pantyushenko MS, Simonov VM, Shukurov RR, Khamitov RA, Vishnevskiy AYU. Physico-chemical and biological properties of biosimilar and reference tissue plasminogen activator products. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(1):39–49. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-39-49>

Corresponding author: Aleksandr Yu. Vishnevskiy; vishnevskiy@ibcgenerium.ru

Тканевой активатор плазминогена (tPA) является мультидоменной сериновой протеиназой, катализирующей реакцию превращения плазминогена (Pgn) в плазмин (Plm) расщеплением R₅₆₁-V₅₆₂. tPA представляет собой гликопептид, состоящий из 527 аминокислот, которые формируют пять пространственных доменов четырех типов: (1) А-домен фибриноектинового типа I фингер-домен — последовательность 1–43; (2) GF-подобный домен — последовательность 44–91; (3–4) два крингл-домена (kringle I — последовательность 92–173, kringle II — последовательность 180–261), соответствующие крингл-доменам плазминогена и протромбина; (5) протеазный С-концевой фрагмент (последовательность 276–527), гомологичный трипсиновым сериновым протеазам, содержит активный каталитический сайт, состоящий из His322, Asp371 и Ser478 (рис. 1). Присутствующие 35 остатков цистеина образуют 17 внутримолекулярных дисульфидных связей.

Основная роль tPA, экспрессируемого клетками эндотелия сосудов, заключается в разрушении фибриновых полимеров посредством активации плазмينا, поэтому рекомбинантный человеческий tPA используется для лечения заболеваний, связанных с тромбообразованием (таких, как инфаркт миокарда, ишемический инсульт и эмболия легочной артерии).

В 1987 году FDA одобрило регистрацию ЛП Актилизе® («Берингер Ингельхайм Интернешнл ГмбХ», Германия) — рекомбинантного человеческого tPA (МНН *Алтеплаза*), отличающегося от ранее созданных препаратов преимущественным фибринолитическим действием и очень слабым влиянием на фибриноген плазмы.

Компанией АО «ГЕНЕРИУМ» (Россия) разработан и зарегистрирован рекомбинантный человеческий тканевой активатор плазминогена (в лекарственной форме лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, 50 мг) под торговым названием Ревелиза®, являющийся полным аналогом по составу, дозировке и лекарственной форме ЛП Актилизе®.

Для регистрации биоподобных лекарственных средств необходимо после оценки качества и доказательств его соответствия установленным требованиям показать схожесть параметров качества, эффективности и безопасности с референтным биологическим ЛП (в такой же лекарственной форме и при идентичном способе введения). Принципы сравнительной оценки биоподобных препаратов подробно изложены в отечественных¹ и международных² нормативных документах. Выбранные методы анализа должны максимально выявить возможные различия в сравниваемых препаратах, способные повлиять на эффективность и безопасность.

Цель работы — провести комплексное исследование сопоставимости физико-химических и биологических характеристик лекарственного препарата Ревелиза® и референтного препарата Актилизе® для оценки их биоподобия.

Материалы и методы

Материалы

Все исследования проводили, используя три серии референтного ЛП Актилизе® (серия 606428, дата выпуска: 09.2016, годен до: 09.2019; серия 604030, дата выпуска: 09.2016, годен до: 09.2019; серия 606119, дата выпуска: 09.2016, годен до: 09.2019) и три серии биоподобного ЛП Ревелиза® (серия 011115, дата выпуска: 11.2015, годен до: 12.2017; серия 010116, дата выпуска: 01.2016, годен до: 02.2018; серия 020516, дата выпуска: 05.2016, годен до: 06.2018).

Методы

1. Пептидное картирование ОФ-ВЭЖХ

Хроматографические процедуры проводили, используя хроматографическую систему высокого давления Waters 2695 (США).

Пробоподготовку образцов *алтеплазы* для пептидного картирования проводили согласно методике, описанной

¹ Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том IV; М.: Полиграф-Плюс; 2014.

² The European Medicines Agency. Similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (EMA/CHMP/BMWP/49348/2005).

The European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies — non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BMWP/403543/2010).

Микрогетерогенность tPA (алтеплаза)

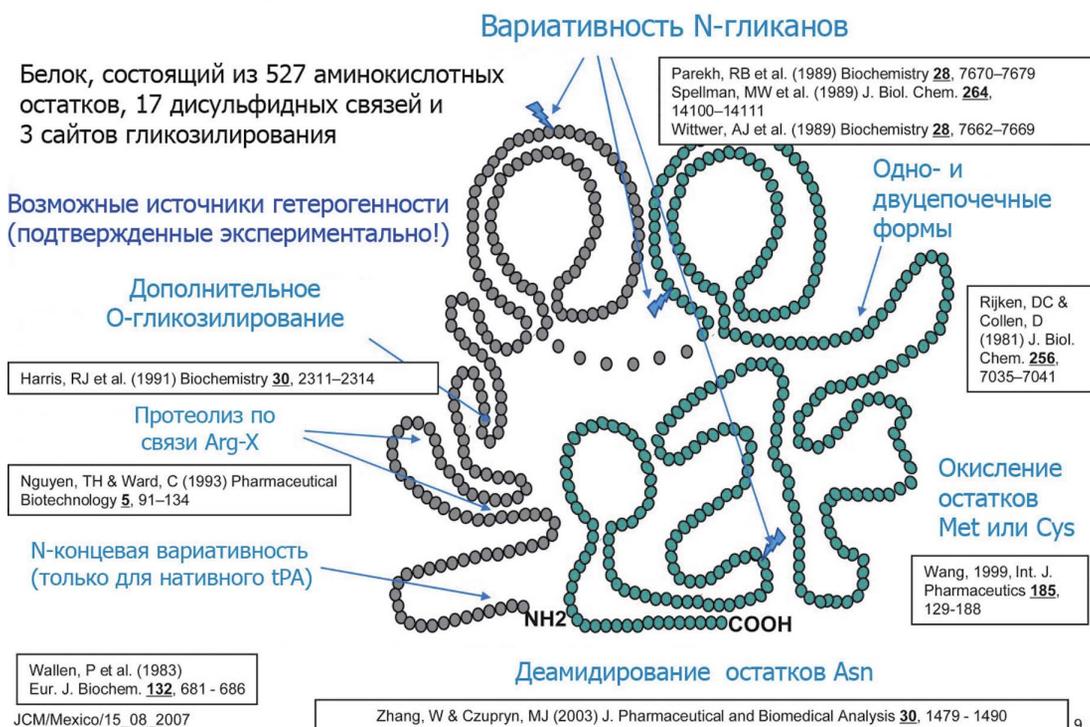


Рис. 1. Пространственная структура алтеплазы с указанием сайтов гетерогенности.
Fig 1. Spatial structure of alteplase with indication of heterogeneity sites.

в EP 9.0³. Разделение триптических гидролизатов осуществляли на колонке YMC-Pack ODS-AQ, 100×4,6 мм, 5 мкм, 200 Å (YMC, Япония) с использованием подвижных фаз следующего состава — А: 66,6 мМ NaH₂PO₄×H₂O, pH 2,85; В: 16,6 мМ NaH₂PO₄×H₂O, 75 % ацетонитрил, pH 2,85. Скорость потока составляла 1 мл/мин, градиент 5–40 % В за 90 мин, 40–80 % В за 30 мин. Детекцию осуществляли при 210 нм.

2. Хромато-масс-спектрометрическое пептидное картирование

Образцы анализируемых серий препаратов алтеплазы денатурировали в буферном растворе, содержащем 6 М мочевины и 0,1 % SDS (pH 8,6), затем восстанавливали 5 мМ ДТТ в течение 1 ч при 50 °С. Алкилирование проводили при помощи раствора 20 мМ йодуксусной кислоты при комнатной температуре в темноте в течение 1 ч. Восстановленный и алкилированный белок переводили ультрафильтрацией в буферный раствор (50 мМ бикарбонат аммония, pH 8,2) при помощи мембранного микроконцентратора с пределом проницаемости 3 кДа. Дегликозилирование образцов проводили обработкой пептид-N-гликозидазой F (ПНГаза F) при 37 °С в течение 16 ч. Протеолиз проводили при температуре 40 °С в течение 6 ч при соотношении трипсина к алтеплазе 1/40 (w/w). Реакцию останавливали титрованием трифторуксусной кислотой до pH 2,0.

Разделение триптических гидролизатов осуществляли на колонке Waters Acquity UPLC CSH Peptide, 2,1×100 мм, 1,7 мкм, 130 Å (Waters). Применяли элюенты следующего состава: фаза А — 0,1 % муравьиная кислота в воде, фаза В — 0,1 % муравьиная кислота в ацетонитриле. Разделение проводили в градиентном режиме (2–26 % В за 32 мин, 26–35 % В за 2 мин) при скорости потока 0,5 мл/мин.

3. Молекулярная масса

Определение проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС после очистки белков от полимеров и низкомолекулярных примесей при помощи ультрафильтрации и дегликозилирования образца ПНГазой F. Разделение осуществляли на колонке Agilent PLRP-S, 2,1×50 мм, 1000 Å, 5,0 мкм. Применяли элюенты следующего состава: фаза А — 0,1 % муравьиная кислота в воде, фаза В — 0,1 % муравьиная кислота в ацетонитриле. Разделение проводили в градиентном режиме (20–50 % В за 11 мин) при скорости потока 0,25 мл/мин.

4. Профиль N-гликозилирования

Подготовку образцов проводили при помощи набора GlykoPrep N-Glycan Sample Preparation kit (ProZyme, #GP96NG-LB). Селективное дегликозилирование модифицированных остатков аспарагина осуществляли при помощи ПНГазы F, затем проводили карбоксилирование образующихся гликозиламинов с образованием флуоресцентных производных N-гликанов. Разделение меченых олигосахаридов проводили при помощи гидрофильной ВЭЖХ с использованием колонки TSKgel Amide-80, 2,0×150 мм, 3 мкм (Tosoh Bioscience) при скорости потока 0,2 мл/мин. Использовали элюенты следующего состава: фаза А — 60 мМ формиат аммония в воде с добавлением 75 % ацетонитрила, фаза В — водный 115 мМ раствор формиата аммония с 54 % ацетонитрила. Для лучшего разделения применяли градиент от 20 до 70 % В в течение 100 мин. Детекцию N-гликанов осуществляли по сигналу флуоресценции при 345 нм в результате возбуждения светом с длиной волны 285 нм.

5. Масс-спектрометрические измерения

Во всех экспериментах для определения *m/z* (отношения массы к заряду) использовали времяпролетный квадруполь-

³ European Pharmacopoeia 9th Edition. 07/2013:1677 Alteplase for injection.

ный масс-детектор Agilent QTOF 6550 с источником ионов Dual Jet Stream в режиме мониторинга положительных ионов. При измерении массы полноразмерного белка деконволюцию спектров выполняли методом максимальной энтропии. Для подтверждения аминокислотной последовательности детектирование проводили, используя фронтально-зависимый тандемный режим сканирования. При соотношении регистрируемых масс пептидов с их возможной структурой учитывались наиболее распространенные посттрансляционные модификации: дезамидирование глутамина и аспарагина, окисление, а также O-гликозилирование. Массу анализируемых N-гликанов вычисляли в виде разницы: $M - 261,14773$, где M — регистрируемое значение массы олигосахаридов, меченных флуорофором InstantPC™.

6. Сиаловые кислоты

Определение общего содержания сиаловых кислот проводили резорциноловым методом Свеннерхольма. Для этого к 100 мкл образцов *алтеплазы* (2 мг/мл) прибавляли 20 мкл 40 мМ йодной кислоты и инкубировали в течение 35 мин на льду, затем прибавляли 250 мкл резорцинолового реагента и после инкубации в течение 5 мин на льду переносили образцы в термостат, нагретый до 95 °С. Через 15 мин образцы охлаждали до комнатной температуры, прибавляли по 250 мкл этанола и инкубировали 3 мин при 37 °С. После охлаждения до комнатной температуры измеряли поглощение при длине волны 600 нм.

7. Нейтральные сахара

Количественное определение нейтральных сахаров в образцах *алтеплазы* проводили согласно методике, описанной в EP 9.0⁴.

8. Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ ЭФ)

Анализ образцов *алтеплазы* проводили по методу Лэммли в 10 % полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях, перед анализом образцы прогревали при 100 °С в течение 5 мин в присутствии ДТТ. Окрашивание солями серебра проводили согласно инструкции к набору Silver Stain Plus™ kit (Bio-Rad).

9. Содержание мономера и одноцепочечной формы

Для количественного определения хроматографической чистоты (содержание мономера), а также содержания одноцепочечной формы *алтеплазы* применяли гель-фильтрационную хроматографию на колонке TSK gel G3000SW 7,5×600 мм (Tosoh Bioscience, Германия) с использованием подвижной фазы на основе фосфатного буферного раствора, содержащего 0,1 % SDS. В нативных условиях образцы анализировали без предварительной пробоподготовки; для определения содержания одноцепочечной и двухцепочечной форм *алтеплазы* дисульфидные связи в образцах предварительно восстанавливали при помощи ДТТ.

10. Взаимодействие алтеплазы с фибрином

Для количественной характеристики специфического взаимодействия *алтеплазы* с фибрином использовали метод поверхностного плазмонного резонанса на приборе Biacore T200 (GE, США). Для этого фибриноген ковалентно иммобилизовали на поверхность сенсора CM5, после чего конвертировали в фибрин в присутствии тромбина, как описано P. Björquist [1]. Для определения равновесной константы диссоциации (KD) комплекса *алтеплаза*–фибрин использовали одноциклоvый анализ, при котором последовательно без промежуточных регенераций на поверхность сенсора с иммобилизованным фибрином подавали разные концентрации

алтеплазы. По достижении равновесия между свободной и связанной формами *алтеплазы* при данной концентрации *алтеплазы* и при равном количестве иммобилизованного на сенсоре фибрина вычисляли равновесную KD образования межмолекулярного комплекса.

11. Взаимодействие алтеплазы с PAI-1

Для количественной характеристики специфического взаимодействия *алтеплазы* с PAI-1 использовали метод поверхностного плазмонного резонанса на приборе Biacore T200 (GE, США). PAI-1 (ингибитор активации плазминогена первого типа) относится к классу серпинов, для них характерно практически необратимое взаимодействие с мишенью [2]. В связи с этим для сравнительной характеристики вычисляли кинетические константы скорости ассоциации формирующегося комплекса. Для этого PAI-1 ковалентно иммобилизовали на поверхность сенсора CM5 до уровня 300 RU, после чего подавали возрастающие концентрации *алтеплазы*, наблюдая в реальном времени за скоростью формирования комплекса на поверхности сенсора. Анализ проводили в одноциклоvом формате, после чего вычисляли кинетическую константу скорости ассоциации формирующегося на сенсоре комплекса.

12. Определение активности алтеплазы

Определение активности *алтеплазы* в составе референтного лекарственного препарата Актилизе® и активности *алтеплазы* в составе биоаналогичного препарата Ревелиза® проводили согласно методике, описанной в EP 9.0⁵. Для этого в пробирки вносили по 1 мл раствора фибриногена (2 мг/мл) и 20 мкл раствора плазминогена (1 мг/мл). В другой набор пробирок вносили 300 мкл раствора тромбина и по 300 мкл раствора стандартного образца или раствора испытуемых образцов, которые затем добавляли в пробирки, содержащие смесь плазминоген/фибриноген. Время добавления раствора фиксировали. Перемешивали полученную смесь и переносили пробирки в водяную баню, предварительно прогретую до 37 °С. В течение приблизительно 30 с образовывался сгусток. Время лизиса сгустка определяли как время от момента добавления образца в раствор до момента поднятия на поверхность последнего пузырька воздуха.

С помощью калибровочного графика зависимости десятичного логарифма активности стандарта $\lg(U)$ от десятичного логарифма значения времени лизиса $\lg(t)$ определяли специфическую фибринолитическую активность *алтеплазы*.

Результаты и обсуждение

Рекомбинантный белок tPA имеет три сайта N-гликозилирования. Известно, что первый (Asn117) модифицирован преимущественно олигоманнозными и, в меньшей мере, гибридными олигосахаридами [3], в то время как два остальных сайта (Asn184 и Asn448) содержат преимущественно комплексные структуры [4]. Помимо N-гликанов молекула *алтеплазы* также содержит связанную по остатку треонина (Thr61) фукозу [5]. Показано, что вариабельность модификации по сайту Asn184 приводит к образованию форм белка с двумя (тип II) или тремя (тип I) присутствующими олигосахаридными фрагментами. Как правило, рекомбинантный tPA синтезируется в виде смеси молекул обоих типов в соотношении, близком к единице [6]. Функциональные различия между формами выражаются в аффинности к фибрину (II тип связывает лучше), а также на уровне скорости выведения препарата из организма [7–9].

⁴ European Pharmacopoeia 9th Edition. 07/2013:1677 Alteplase for injection.

⁵ Там же.

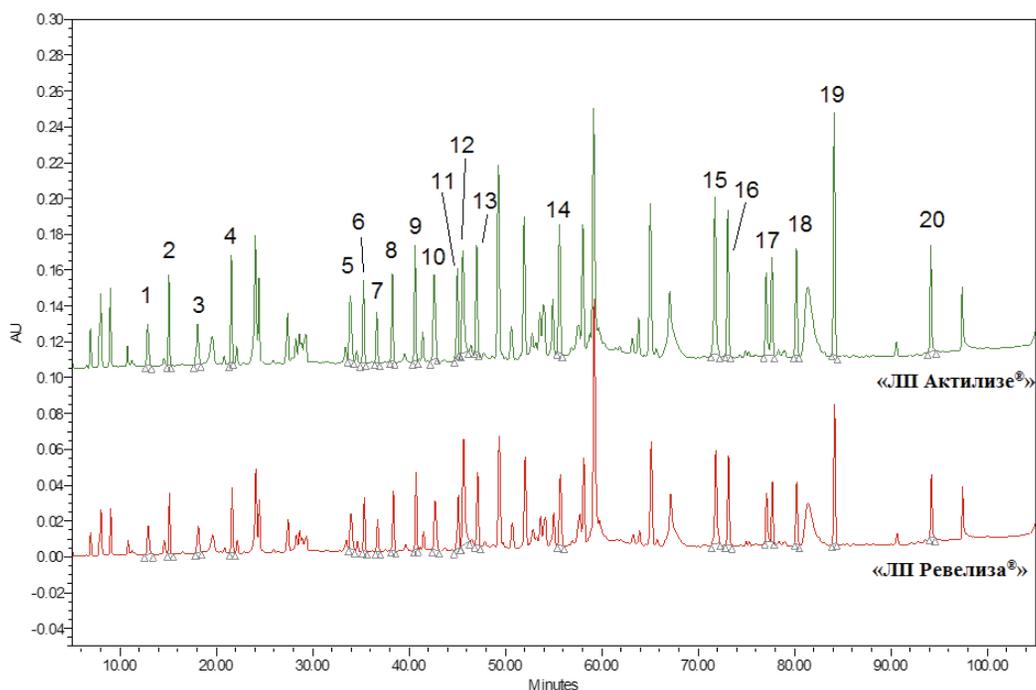


Рис. 2. Пептидное картирование алтеплазы (аминокислотная последовательность пептидов указана в таблице 1).
 Fig 2. Peptide mapping of alteplase (the amino acid sequence of peptides is shown in Table 1).

Первичная структура

Для подтверждения идентичности первичной структуры алтеплазы в сравниваемых препаратах было проведено пептидное картирование триптических гидролизатов методом ОФ-ВЭЖХ. При сравнении пептидных карт референтного и биоаналогичного препаратов (рис. 2) различий выявлено не было, полученные хроматограммы совпадают с пептидной картой алтеплазы, приведенной в EP 9.0⁶. Идентифицированные таким способом пептидные фрагменты (табл. 1) представляют более 55 % всей последовательности молекулы [10].

Интактные молекулярные массы одноцепочечной и двухцепочечной форм алтеплазы, определенные масс-спектрометрически, составили 56958 и 34776 Да соответственно при полном совпадении спектров сравниваемых препаратов (рис. 3). Помимо определения молекулярной массы используемая методика позволила провести полное подтверждение аминокислотной последовательности молекулы алтеплазы в составе всех сравниваемых образцов. Также была проведена идентификация сайтов посттрансляционных модификаций, в результате которой было подтверждено наличие 11 сайтов дезамидирования (Q₁₇, N₂₉, Q₄₂, N₁₄₀, N₂₀₅, Q₂₂₂, Q₇₅, N₉₅, N₂₁₁, N₂₄₁, N₂₄₉) и трех сайтов окисления (M₁₃, M₁₈₀, M₂₀₇). Также в каждом из белков были подтверждены два сайта N- и один сайт O-гликозилирования.

На основании совокупности полученных данных по анализу первичной структуры алтеплазы референтного препарата и препарата-аналога можно сделать вывод об идентичности их аминокислотной последовательности и сходстве характера посттрансляционных модификаций.

Гликозилирование

В ходе данного исследования было проведено количественное определение индивидуальных компонентов профиля

N-гликанов методом ВЭЖХ гидрофильного взаимодействия с одновременным подтверждением их структуры при помощи сканирующего масс-спектрометра. Для этого проводили высокоспецифическое ферментативное отщепление гликанов от молекулы белка с последующей модификацией флуорофором InstantPC™. Основной набор наблюдаемых структур представлен на рисунке 4 и является в значительной мере сходным среди сравниваемых препаратов. Уникальные гликаны обнаружены не были. Хотя Актилизе® и Ревелиза® продемонстрировали небольшие различия в процентном распределении олигосахаридов и их групп, тем не менее везде основной вклад вносили олигоманнозные структуры, а также би-, три- и полиантенные комплексные гликаны, что согласуется с данными литературы [3, 4, 6]. В исследуемых образцах в незначительном количестве были обнаружены остатки N-гликолилнейраминовой кислоты, которые могут входить в гликановый состав белков, синтезируемых клетками СНО. Другой из известных антигенов углеводной природы — мотив Gal(α1,3)-Gal — зарегистрирован не был. Поскольку часто функциональное влияние оказывается не отдельной модификацией, а целой группой сходных по структуре олигосахаридов, проведение оценки вкладов индивидуальных компонентов гликопрофиля принято осуществлять на комплексном уровне. Ряд таких интегральных характеристик представлен в таблице 2.

Сходство/подобие профилей гликозилирования референтного и исследуемого препаратов является основанием для заключения на этапе оценки качества вопроса о рассмотрении разработанного препарата как биоподобного. В ходе исследования были установлены отличия в процентном содержании мультиантенных комплексных гликанов. Нужно отметить, что все структуры этой группы содержат до четырех остатков N-ацетилнейраминовой кислоты одновременно и являются наиболее весомыми носителями отрицательного заряда. Таким

⁶ European Pharmacopoeia 9th Edition. 07/2013:1677 Alteplase for injection.

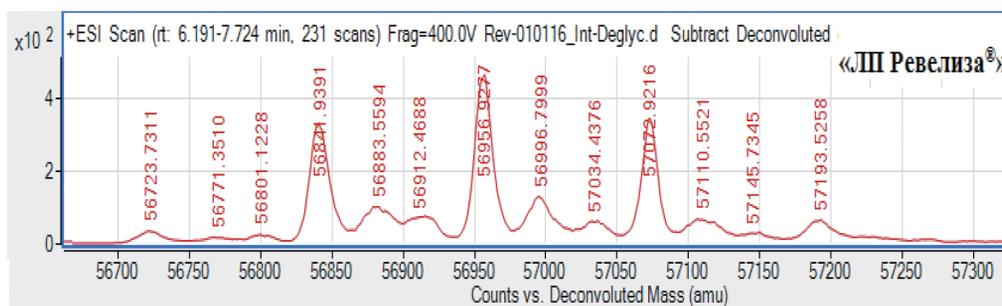
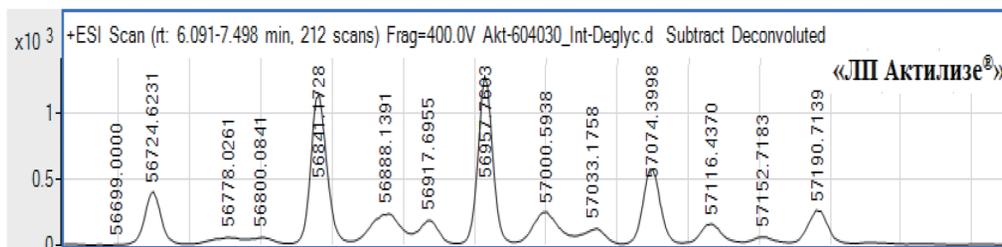
Таблица 1. Список идентифицированных пептидных фрагментов *алтеплазы* (пептидное картирование ОФ-ВЭЖХ)
Table 1. The list of identified peptide fragments of *alteplase* (peptide mapping by RP-HPLC)

Пик	Триптический пептид	Фрагмент	Последовательность
1	T7	50–55	SCSEPR
2	T20	229–233	HNYCR
3	T12	130–135	RPDAIR
4	T36	357–361	YIVHK
5	T3a	11–23	TQMIYQQHQSLR
	T3c	22–27	LRPVLR
	T18a	208–212	ILIGK
	T49	506–513	DVPGVYTK
6	T25	268–275	QYSQPQFR
7	T1	1–7	SYQVICR
8	T10	90–101	ATCYEDQGISYR
9	T13	136–145	LGLGNHNYCR
10	T34	343–351	VVPGEEEEQK
	T35	352–356	FEVEK
11	T46	450–462	TVTDMNMLCAGDTR
12	T4	28–30	SNR
	T5	31–40	VEYCWCNSGR
13	T41	417–427	HEALSPFYSER
	T19	213–228	VYTAQNPSAQALGLGK
14	T32a	328–339	FPPHHLTVILGR
	T47	463–489	SGGPQANLHDACQGDSGGPLVCLNDGR
15	T50	514–522	VTNYLDWIR
16	T37	362–378	EFDDDTYDNDIALQLK
17	T8	56–82	CFNGGTCQQALYFSDFCQCEPGFAGK
18	T18	190–212	GTHSLTESGASCLPWNSMILIGK
19	T27	278–291	GGLFADIASHPWQAAIFAK
20	T48	490–505	MTLVGIISWGLGCGQK

Таблица 2. Процентная площадь пиков гликанов по данным ВЭЖХ гидрофильного взаимодействия
Table 2. Percentage peak area of glycans determined by hydrophilic interaction HPLC

Группа N-гликанов	ЛП Актилизе®			ЛП Ревелиза®		
	606428	604030	606119	011115	010116	020516
1. Заряженные	62,2	66,4	64,2	61,9	62,9	64,3
Среднее значение	64±2			63±1		
2. Олигоманнозные	31,1	28,6	29,7	28,6	32,1	29,9
Среднее значение	30±1			30±2		
3. Фукозилированные	65,1	58,9	63,1	58,4	63,9	60,2
Среднее значение	62±3			61±3		
4. Галактозилированные	69,3	66,6	64,9	68,5	67,8	70,9
Среднее значение	67±2			69±2		
5. Комплексные биантенные	42,6	37,2	34,8	32,2	28,3	33,6
Среднее значение	38±4			31±3		
6. Комплексные мультиантенные	26,4	30,1	27,4	40,1	34,8	39,1
Среднее значение	28±2			38±3		
7. С N-гликолилнейраминовой кислотой	Не более 2	Не более 4	Не более 2	Не более 1	Не более 2	Не более 1
Среднее значение	Не более 4			Не более 2		

Одноцепочечная форма



Двухцепочечная форма

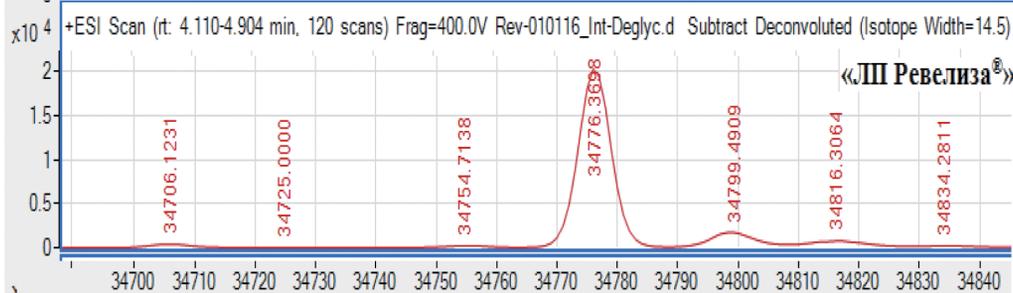
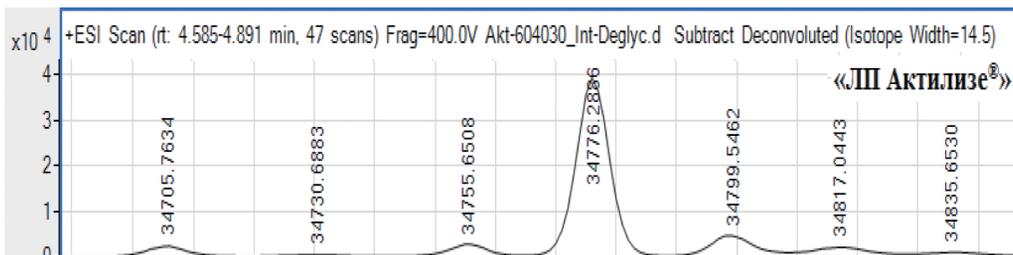


Рис. 3. Определение молекулярной массы алтеплазы.
 Fig. 3. Determination of alteplase molecular weight.

образом, несмотря на сходные значения общих сумм площадей всех заряженных N-гликанов, для ЛП Ревелиза® стоило ожидать несколько большего абсолютного содержания сиаловой кислоты. Это предположение подтверждается результатом прямого определения сиаловых кислот (табл. 3), однако полученные значения не выходят за пределы рекомендуемых EP 9.0 норм.

Вместе с оценкой общего содержания нейтральных сахаров полученные данные позволяют считать исследованные препараты сопоставимыми, так как различия в количестве комплексных мультиантенных гликанов между препаратами могут быть отнесены к незначительным и не сказываются на биологических свойствах алтеплазы *in vitro* (табл. 4–6).

Чистота

Помимо вариаций паттерна гликозилирования нормируемым показателем качества ЛП алтеплазы является соотношение одноцепочечной (интактной) и двухцепочечной (рас-

щепленной) форм молекулы. Интактная форма алтеплазы (1–277 аминокислотные остатки) при переходе в активную форму расщепляется между остатками R₂₇₅ и I₂₇₆, что приводит к образованию двух отдельных цепей 1–275 и 276–527, которые удерживаются вместе посредством дисульфидных связей (рис. 1). Среди продуктов расщепления пептид 276–527 обладает меньшей молекулярной массой и содержит единственный сайт N-гликозилирования (N₄₄₈), в то время как второй из пептидов (1–275) обычно полностью гликозилирован по положению N₁₁₇ и частично по положению N₁₈₄. В том случае если последний из сайтов модифицирован (тип I), алтеплаза проявляет пониженную специфическую активность и сродство к фибрину [7, 8]. Кроме того, эта форма отличается от негликозилированной (тип II) по молекулярной массе. Это позволяет идентифицировать их методом ПААГ ЭФ (рис. 5). Две близкие по интенсивности полосы в области 37 кДа свидетельствуют

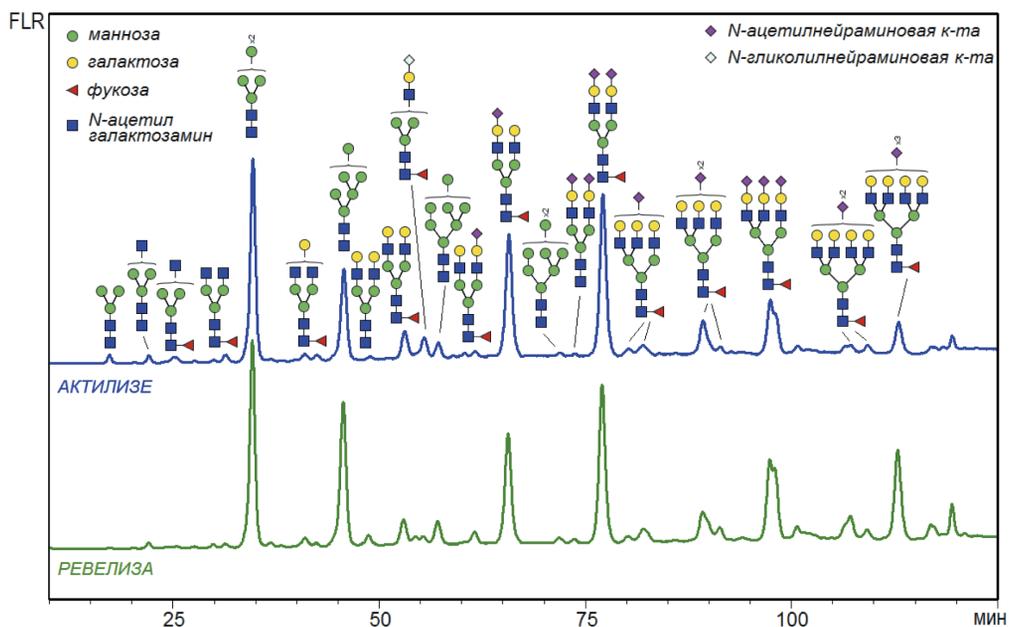


Рис. 4. Профиль N-гликозилирования алтеплазы.
 Fig. 4. N-Glycosylation profile of alteplase.

Таблица 3. Содержание нейтральных сахаров и сиаловых кислот в ЛП Актилизе® и ЛП Ревелиза®
 Table 3. The content of neutral sugars and sialic acids in Actilyse® and Revelyse®

Модификация	Содержание модификаций, моль, на моль алтеплазы						Норма по EP 9.0
	ЛП Актилизе®			ЛП Ревелиза®			
	606428	604030	606119	011115	010116	020516	
1. Нейтральные сахара	13,69	14,19	14,12	12,89	13,10	13,92	8,4–15,6
Среднее значение	14,00±0,27			13,30±0,54			
2. Сиаловые кислоты	2,85	2,84	2,72	3,02	3,15	2,96	2,1–3,9
Среднее значение	2,80±0,07			3,04±0,10			

Таблица 4. Сравнение вычисленных равновесных констант диссоциации комплекса алтеплаза–фибрин
 Table 4. Comparison of the calculated equilibrium dissociation constants of the alteplase–fibrin complex

Алтеплаза	Серия	KD, М		Критерий сопоставимости, %
		измеренное	среднее по сериям	
ЛП Актилизе®	606428	$4,59 \cdot 10^{-7}$	$(4,35 \pm 0,22) \cdot 10^{-7}$	100,0
	604030	$4,32 \cdot 10^{-7}$		
	606119	$4,15 \cdot 10^{-7}$		
ЛП Ревелиза®	011115	$4,42 \cdot 10^{-7}$	$(4,20 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	103,5
	010116	$4,14 \cdot 10^{-7}$		
	020516	$4,03 \cdot 10^{-7}$		

Таблица 5. Сравнение вычисленных кинетических констант скоростей ассоциации комплекса алтеплаза–PAI-1
 Table 5. Comparison of the calculated kinetic rate constants of association of the alteplase–PAI-1 complex

Алтеплаза	Серия	Ka (1/Ms)		Критерий сопоставимости, %
		измеренное	среднее по сериям	
ЛП Актилизе®	606428	$2,13 \cdot 10^6$	$(2,20 \pm 0,09) \cdot 10^6$	100,0
	604030	$2,27 \cdot 10^6$		
	606119	$2,20 \cdot 10^6$		
ЛП Ревелиза®	011115	$2,10 \cdot 10^6$	$(2,12 \pm 0,02) \cdot 10^6$	103,8
	010116	$2,14 \cdot 10^6$		
	020516	$2,12 \cdot 10^6$		

Таблица 6. Специфическая активность *алтеплазы*. Лизис фибринового сгустка
Table 6. *Alteplase* specific activity. Fibrin clot lysis

<i>Алтеплаза</i>	Серия	Активность, МЕ/мг		Критерий сопоставимости, %
		измеренное	среднее по сериям	
ЛП Актилизе®	606428	624166,8	625162±9589	106–109
	604030	616108,4		
	606119	635209,5		
ЛП Ревелиза®	011115	615216,2	610424±17740	102–108
	010116	590779,9		
	020516	625276,0		

Таблица 7. Хроматографическая чистота и содержание одноцепочечной формы в препаратах *алтеплазы*
Table 7. Chromatographic purity and the content of single-stranded form in *alteplase* products

Форма <i>алтеплазы</i>	Содержание формы, %		
	ЛП Актилизе®	ЛП Ревелиза®	Норма по EP 9.0
Мономер	97,90±0,17	96,80±0,36	Не менее 95
Одноцепочечная форма	82,2±0,4	80,6±1,9	Не менее 60

о сопоставимом количестве молекул *алтеплазы* обоих типов. Также на электрофореграмме идентифицируется одноцепочечная форма 1–527, представляющая собой широкую полосу с молекулярной массой около 60 кДа, которая не разделяется на ПААГ ЭФ в силу избыточного гликозилирования.

Количественное соотношение одноцепочечной и двухцепочечной форм *алтеплазы* в референтном и биоаналогичном препаратах было определено при помощи гель-фильтрации одновременно с определением хроматографической чистоты (рис. 6). Предварительное расщепление дисульфидных связей при помощи ДТТ приводит к диссоциации двухцепочечной формы на два отдельных фрагмента с молекулярными массами около 30 кДа, один из которых содержит крингл-домен, другой — протеазный домен. Как следует из полученных данных (табл. 7), сравниваемые препараты сопоставимы как по хроматографической чистоте (содержание мономера), так и по содержанию одноцепочечной формы.

Сродство к фибрину и PAI-1

Специфическое сродство *алтеплазы* к фибрину и PAI-1 проявляется в процессе регуляции фибринолиза путем активации плазминогена в присутствии фибринового сгустка. При этом природный ингибитор *алтеплазы* PAI-1 осуществляет контроль за количеством *алтеплазы*, способным активировать плазминоген. Для сравнительной характеристики специфического сродства ЛП Актилизе® и ЛП Ревелиза® в реальном времени сравнивали скорости формирования межмолекулярных комплексов *алтеплазы* как с фибрином, так и с PAI-1. Данные результатов анализа трех серий каждого препарата представлены в таблицах 4 и 5. Полученные данные позволяют считать ЛП биоподобными при критерии сопоставимости (отношение значений серии референтного препарата к остальным измеренным данным, выраженным в процентах), не выходящем за диапазон 80–125 %.

Определение активности *алтеплазы*

Тканевой активатор плазминогена (tPA, *алтеплаза*) — один из ключевых компонентов системы лизиса фибринового сгустка (фибринолиза). После системного введения препарата tPA находится в плазме в неактивной форме до связывания с фибрином (нерастворимый белок, образующийся в процессе свертывания крови). tPA активирует переход плазминогена

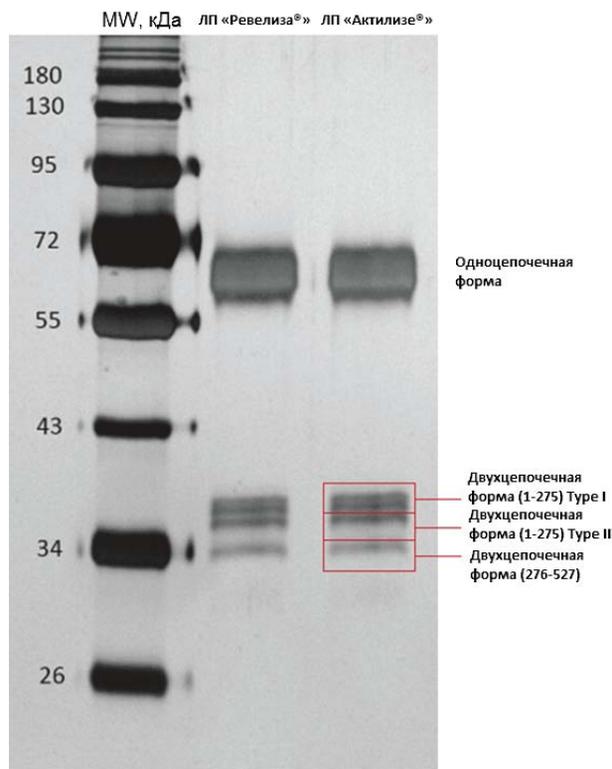


Рис. 5. Электрофореграмма *алтеплазы* в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях.

Fig. 5. Electrophoregram of *alteplase* in polyacrylamide gel under denaturing conditions.

в плазмин, который, в свою очередь, осуществляет деградацию фибрина, что ведет к растворению фибринового сгустка и повышает тромболитический эффект (растворение сгустка крови) только в ткани тромба.

Как следует из данных, представленных в таблице 6, специфическая активность ЛП Ревелиза® сопоставима с активностью референтного препарата Актилизе®. Данные значения входят в рекомендуемый EP 9.0 диапазон 90–110 % от установленной эталонной активности 580000 МЕ/мг.

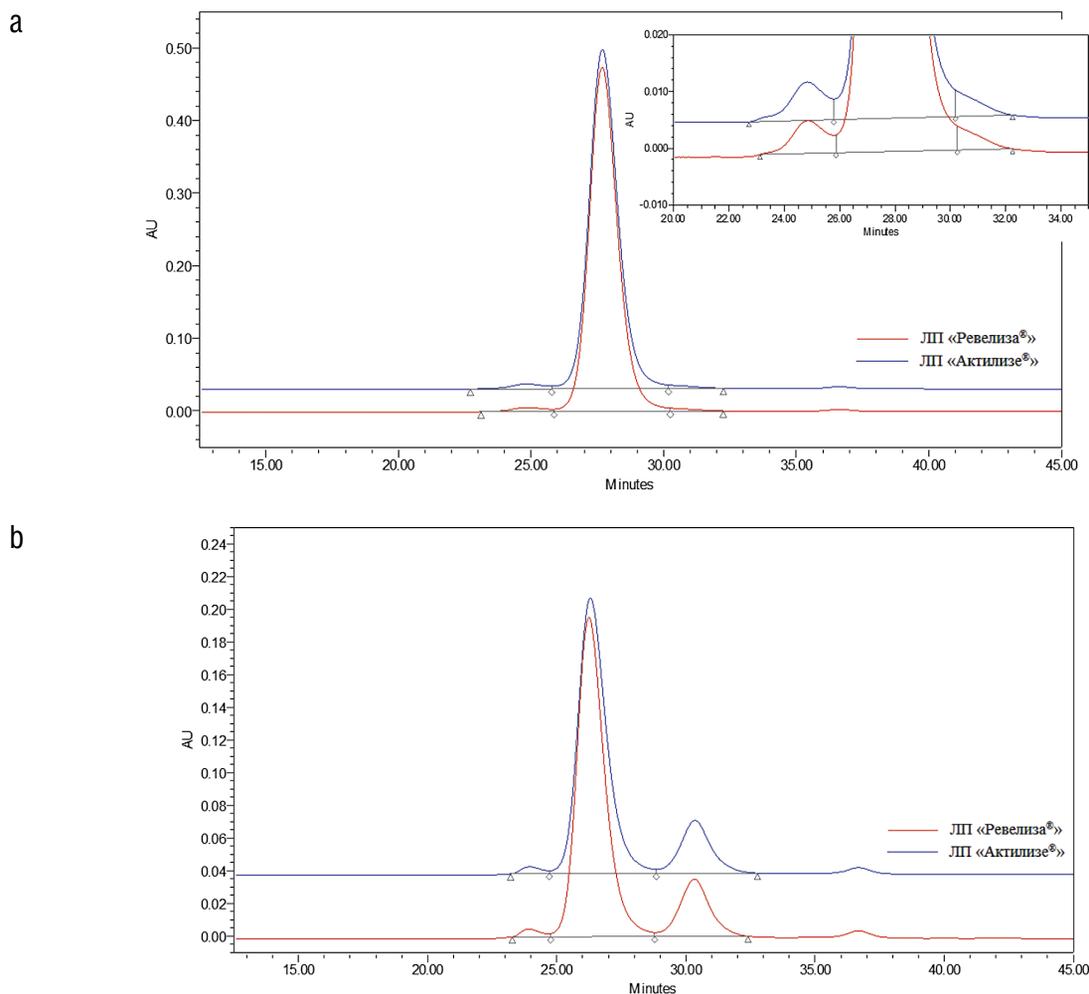


Рис. 6. Содержание мономера (а) и одноцепочечной формы (б), определенное методом гель-фильтрации.
Fig. 6. The content of monomer (a) and single-chain form (b) determined by gel filtration.

Заклyчение

В ходе данного исследования была проведена комплексная сравнительная характеристика *алтеплазы* в составе референтного лекарственного препарата Актилизе® и биоаналогичного препарата Ревелиза®. В случае сложных белковых молекул, таких как *алтеплаза*, необходимо подтвердить как идентичность первичной аминокислотной последовательности, так и детально характеризовать участки молекулы, влияющие на биологическую активность и потенциальную безопасность.

Одним из факторов, влияющих на активность *алтеплазы* (лизис сгустка), является профиль гликозилирования, который незначительно различается у сравниваемых препаратов. Содержание индивидуальных гликанов, определенное при помощи ВЭЖХ гидрофильного взаимодействия, в случае ЛП Ревелиза® по отношению к референтному ЛП Актилизе® сдвинуто в сторону комплексных разветвленных структур, содержащих сиаловую кислоту, что подтверждается анализом общего ее количества, а также анализом содержания нейтральных сахаров.

Тем не менее препараты продемонстрировали высокую степень сходства/подобия при исследовании специфичности и активности *алтеплазы*, несмотря на различия в количестве комплексных мультиантенных гликанов между препаратами.

Известно, что при попадании в организм пациента вся одноцепочечная форма практически мгновенно переходит

в активную двухцепочечную, в связи с чем ЕР 9.0 регламентирует содержание одноцепочечной формы в количестве не менее 60 %. Определение содержания соотношения одноцепочечной/двухцепочечной форм было проведено двумя независимыми методами: ПААГ ЭФ и гель-фильтрационной ВЭЖХ. Электрофоретические профили сравниваемых препаратов демонстрируют высокую степень сходства; количественное содержание одноцепочечной формы близко к 80 %. Также при помощи выбранных методик была продемонстрирована сопоставимая степень чистоты препаратов.

Показано, что специфическая активность сравниваемых препаратов, а также их сродство к фибрину и PAI-1 (необходимое для регуляции фибринолиза) статистически сопоставимы.

На основании полученных данных, указывающих на отсутствие различий в структуре, выявленной незначительной гетерогенности в зарядах и содержании примесей, а также сопоставимой специфической активности, может быть сделано заключение о том, что лекарственный препарат Ревелиза® биоаналогичен референтному препарату Актилизе® по физико-химическим и биологическим свойствам.

Благодарности. Выражаем благодарность всему коллективу отдела аналитических методов МБЦ «ГЕНЕРИУМ» за советы и поддержку в работе над проектом. Научному сотруднику М.А. Смолу за разработку методов анализа

гликанов и важные замечания к статье. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to the entire team of the Analytical Methods Department of the International Biotechnology Center «GENERIUM» for their advice and support with regard to this project; and to the researcher M.A. Smolov for the development of methods of glycan analysis and important comments on the paper. The study was performed without external funding.

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. Guzzetta AW, Basa LJ, Hancock WS, Keyt BA, Bennett WF. Identification of carbohydrate structures in glycoprotein peptide maps by the use of LC/MS with selected ion extraction with special reference to tissue plasminogen activator and a glycosylation variant produced by site directed mutagenesis. *Anal Chem.* 1993;65(21):2953–62.
2. Spellman MW, Basa LJ, Leonard CK, Chakel JA, O'Connor JV, Wilson S, van Halbeek H. Carbohydrate structures of human tissue plasminogen activator expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1989;264(24):14100–11.
3. Harris RJ, Leonard CK, Guzzetta AW, Spellman MW. Tissue plasminogen activator has an O-linked fucose attached to threonine-61 in the epidermal growth factor domain. *Biochemistry.* 1991;30(9):2311–4.

Об авторах

Гусарова Валентина Дмитриевна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела аналитических методов ООО «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ»

Пантюшенко Мария Семеновна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела аналитических методов ООО «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ»

Симонов Владимир Михайлович, научный сотрудник отдела аналитических методов ООО «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ»,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0879-5595>

Шукуров Рахим Рахманкулович, канд. биол. наук, начальник лаборатории физико-химических методов отдела аналитических методов ООО «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ»,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>

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

Вишневицкий Александр Юрьевич, канд. биол. наук, начальник отдела аналитических методов ООО «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ»,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7865-9361>

Поступила 07.02.2019
После доработки 13.02.2019
Принята к публикации 14.02.2019

4. Parekh RB, Dwek RA, Thomas JR, Opdenakker G, Rademacher TW, Wittwer AJ, et al. Cell-type-specific and site-specific N-glycosylation of type I and type II human tissue plasminogen activator. *Biochemistry.* 1989;28(19):7644–62.
5. Wittwer AJ, Howard SC, Carr LS, Harakas NK, Feder J, Parekh RB, et al. Effects of N-glycosylation on *in vitro* activity of Bowes melanoma and human colon fibroblast derived tissue plasminogen activator. *Biochemistry.* 1989;28(19):7662–9.
6. Berg DT, Burck PJ, Berg DH, Grinnell BW. Kringly glycosylation in a modified human tissue plasminogen activator improves functional properties. *Blood.* 1993;81(5):1312–22.
7. Cole ES, Nichols EH, Poisson L, Harnois ML, Livingston DJ. *In vivo* clearance of tissue plasminogen activator: The complex role of sites of glycosylation and level of sialylation. *Fibrinolysis.* 1993;7(1):15–22. [https://doi.org/10.1016/0268-9499\(93\)90050-6](https://doi.org/10.1016/0268-9499(93)90050-6)
8. Chloupek RC, Harris RJ, Leonard CK, Keck RG, Keyt BA, Spellman MW, et al. Study of the primary structure of recombinant tissue plasminogen activator by reversed-phase high-performance liquid chromatographic tryptic mapping. *J Chromatogr.* 1989;463(2):375–96.
9. Kim PY, Tieu LD, Stafford AR, Fredenburgh JC, Weitz JL. A high affinity interaction of plasminogen with fibrin is not essential for efficient activation by tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem.* 2012;287(7):4652–61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.317719>
10. Björquist P, Brohlin M, Ehneborn J, Ericsson M, Kristansen C, Pohl G, Deinum J. Plasminogen activator inhibitor type-1 interacts exclusively with the proteinase domain of tissue plasminogen activator. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1209(2):191–202.

Authors

Valentina D. Gusarova, Candidate of Biological Sciences, Senior Scientist of the Analytical Methods Department of the International Biotechnology Center «GENERIUM»

Maria S. Pantyushenko, Candidate of Biological Sciences, Senior Scientist of the Analytical Methods Department of the International Biotechnology Center «GENERIUM»

Vladimir M. Simonov, Scientist of the Analytical Methods Department of the International Biotechnology Center «GENERIUM»,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0879-5595>

Rakhim R. Shukurov, Candidate of Biological Sciences, Head of Laboratory of Physicochemical Methods, Analytical Methods Department of the International Biotechnology Center «GENERIUM»,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>

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

Aleksandr Yu. Vishnevskiy, Candidate of Biological Sciences, Head of the Analytical Methods Department of the International Biotechnology Center «GENERIUM»,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7865-9361>

Received 7 February 2019
Revised 13 February 2019
Accepted 14 February 2019

Оптимизация процесса концентрирования микробных клеток в технологии чумных вакцин

Д. А. Шаров, А. А. Лещенко*, С. В. Багин, Д. А. Мохов, С. В. Логвинов, В. В. Крупин, А. В. Ежов, А. Г. Лазыкин, В. В. Бирюков

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения
«48 Центральный научно-исследовательский институт»
Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров),
Октябрьский проспект, д. 119, Киров, 610000, Российская Федерация

На сегодняшний день в технологии вакцины чумной живой используется комбинированный способ концентрирования микробных клеток, состоящий из трех операций суммарной продолжительностью 18 ч. К недостаткам получения концентрата в рамках существующей технологии вакцины относятся ее многооперационность, энергозатратность, продолжительность и, как следствие, малый выход концентрированной суспензии (0,04 л с 1 л нативной культуры). **Цель работы** состояла в оптимизации процесса концентрирования микробных клеток *Yersinia pestis* EV с применением установки тангенциальной микрофльтрации с фильтродержателем АСФ-020. **Материалы и методы:** в исследованиях использовали вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ (Научно-исследовательский институт эпидемиологии и гигиены). Для глубинного выращивания нативной культуры применяли реактор БИОР-0,25. Содержание живых микробных клеток определяли циторефрактометрическим методом. Оценку параметров окислительного метаболизма осуществляли с использованием хроноамперометрического метода. Физико-химические и иммунобиологические свойства вакцины чумной живой сухой определяли в соответствии с ФС.3.3.1.0022.15 Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания. **Результаты:** конструктивные особенности внедряемого оборудования позволили осуществлять мембранную фильтрацию микробной суспензии, используя в качестве емкости промежуточного хранения реактор БИОР-0,25, тем самым исключив три технологические операции. Общая концентрация микробов в суспензии, полученной регламентным и оптимизированным способами, составляла не менее 120 млрд м.кл./мл. Сравнительное изучение влияния различных гидродинамических режимов в рабочих полостях фильтрующих установок АСФ-009 и АСФ-020 существенно не повлияло на морфометрические и физиологические свойства микробных культур. На основании экспериментальных данных составлен материальный баланс процесса мембранной фильтрации. Выход концентрата с 1 л нативной культуры по оптимизированной технологии достигал 0,17 л, продолжительность процесса сократилась до 4 ч. **Выводы:** оптимизирован процесс концентрирования микробных клеток *Y. pestis* EV в технологическом процессе производства чумных вакцин. Сравнительное изучение морфометрических и физиологических свойств культур чумного микроба в процессе их концентрирования по оптимизированной технологии не выявило существенных отличий по сравнению с регламентной.

Ключевые слова: вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV; вакцина чумная живая; технология вакцины чумной живой; показатели окислительного метаболизма; концентрирование микробной суспензии; материальный баланс; микрофльтрация

Для цитирования: Шаров ДА, Лещенко АА, Багин СВ, Мохов ДА, Логвинов СВ, Крупин ВВ, Ежов АВ, Лазыкин АГ, Бирюков ВВ. Оптимизация процесса концентрирования микробных клеток в технологии чумных вакцин. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(1):50–55. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-50-55>

***Контактное лицо:** Лещенко Андрей Анатольевич; NIC48CNII@mail.ru

Optimisation of the Microbial Cell Concentration Procedure in Plague Vaccine Production

D. A. Sharov, A. A. Leshchenko*, S. V. Bagin, D. A. Mokhov, S. V. Logvinov, V. V. Krupin, A. V. Ezhov, A. G. Lazykin, V. V. Biryukov

48 Central Scientific Research Institute (Kirov),
Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation

To date, the technology of live plague vaccine production uses a combined method of concentrating microbial cells which consists of three operations with a total duration of 18 hours. The procedure of obtaining concentrate, which is used in the current vaccine production technology, has a number of disadvantages, namely: multiple operations, high energy consumption, long duration, and, as a consequence, low yield of concentrated suspension (0.04 l from 1 l of native culture). **The aim of the study** was to optimise the procedure of *Yersinia pestis* EV microbial cell concentration using the system for tangential flow microfiltration with the ASF-020 filter support unit.

Materials and methods: the vaccine strain used in the study was *Yersinia pestis* EV derived from NIEG cell line (the strain of the Research Institute of Epidemiology and Hygiene). Submerged cultivation of the native culture was performed using the BIOR-0.25 reactor. The content of live microbial cells was determined by cytofluorimetry. Oxidative metabolism was assessed using the chronoamperometric method. Physico-chemical and immunobiological properties of the dry live plague vaccine were assessed according to the monograph FS.3.3.1.0022.15 of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14 edition. **Results:** the equipment's design features made it possible to carry out membrane filtration of the microbial suspension using the BIOR-0.25 reactor as an intermediate storage unit, thereby excluding three technological stages. The total concentration of microbes in the suspension obtained by the routine and the optimised methods was not less than 120 billion microbial cells/ml. A comparative study of the effect of various hydrodynamic regimes in the working cavities of ASF-009 and ASF-020 filter units did not significantly affect the morphometric and physiological properties of microbial cultures. Experimental data helped to determine the process mass balance of membrane filtration. The optimised technology gave 0.17 l yield of the concentrate from 1 l of native culture, and the process duration was reduced to 4 hours. **Conclusions:** the process of concentrating *Y. pestis* EV microbial cells during production of plague vaccines was optimised. A comparative study of morphometric and physiological properties of plague microbe cultures that was carried out during their concentration using the optimised technology did not reveal any significant differences as compared to the routine one.

Key words: *Yersinia pestis* EV vaccine strain; live plague vaccine; live plague vaccine production technology; oxidative metabolism parameters; concentration of microbial suspension; mass; microfiltration

For citation: Sharov DA, Leshchenko AA, Bagin SV, Mokhov DA, Logvinov SV, Krupin VV, Ezhov AV, Lasykin AG, Biryukov VV. Optimisation of the microbial cell concentration procedure in plague vaccine production. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(1):50–55. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-50-55>

Corresponding author: Andrey A. Leshchenko; NIC48CNII@mail.ru

Одной из важнейших задач производства живых вакцин является совершенствование технологической стадии концентрирования микробных культур, при этом предпочтение отдается отечественному оборудованию и сохранению или улучшению качественных характеристик готового иммунобиологического лекарственного препарата. Решение данной задачи требует своевременного аппаратурного переоснащения, использования высокоэффективных технологических методов и современных конструкционных материалов [1, 2].

На сегодняшний день в технологии вакцины чумной живой используется комбинированный способ концентрирования микробных клеток, состоящий из трех операций — этапов. Он предусматривает первичное осаждение микробной взвеси вакцинного штамма, накопление осадка в емкости промежуточного хранения (40 л) и последующую микрофильтрацию на установке АСФ-009 [3].

К недостаткам получения концентрата в рамках существующей технологии вакцины относятся ее многооперационность, энергозатратность и продолжительность (18 ч). Следствием такого комбинированного способа является малый выход концентрированной суспензии (0,04 л с 1 л нативной культуры) [4]. Такая технология не может называться современной, поскольку не обеспечивает увеличение выхода продукта с единицы объема полуфабриката при минимальных энергетических и временных затратах¹ [5].

Все это определяет актуальность исследований, направленных на оптимизацию регламентного способа получения концентрата микробных клеток в технологии чумных вакцин за счет использования более производительного оборудования.

Цель работы — оптимизация процесса концентрирования микробных клеток *Yersinia pestis* EV с применением установки тангенциальной микрофильтрации с фильтродержателем АСФ-020 в технологии чумных вакцин.

Материалы и методы

В производстве препарата использовали вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV, полученный из Государственной кол-

лекции возбудителей бактериальных инфекций, используемых для разработки и оценки эффективности медицинских средств ПБЗ, филиала ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России (г. Киров) (далее — штамм EV).

Для глубинного выращивания нативной культуры чумного микроба штамма EV применяли реактор БИОР-0,25 (ОАО «Опытно-конструкторское бюро тонкого биологического машиностроения», г. Кириши, Россия). Режимы глубинного культивирования: продолжительность выращивания микробной взвеси — 27 ч; скорость вращения вала перемешивающего устройства — 300 оборотов/мин; объем воздуха, подаваемого для аэрации, удельный расход воздуха на 1 л культуральной жидкости — $(0,20 \pm 0,02)$ л/мин; температура выращивания — (27 ± 2) °С.

Концентрат микробной взвеси, согласно регламенту, получали комбинированным способом в том же реакторе, емкости промежуточного хранения и установке тангенциальной микрофильтрации с фильтродержателем АСФ-009 (далее — установка АСФ-009) (ЗАО «Владисарт», Россия).

Оптимизацию существующей технологии проводили при помощи установки тангенциальной микрофильтрации с фильтродержателем АСФ-020 (далее — установка АСФ-020) (ЗАО «Владисарт», Россия).

Содержание живых микробных клеток определяли циторефрактометрическим методом на микроскопе МБИ-6 с аноптральным контрастом и общим увеличением $\times 1350$. Микробную суспензию готовили путем ее разведения 0,15 М фосфатным буфером на основе одно- и двузамещенных фосфатов калия с рН от 6,9 до 7,0 с добавлением 1,0 % глюкозы и 0,1 % глицерина, а для приготовления препарата использовали желатиновый гель, содержащий 3 % глицерина. Содержание делящихся клеток оценивали в фазовом контрасте на микроскопе «Люмам ИЗ». Документирование и анализ размеров микробных клеток осуществляли на микроскопе «Биомед-4ПР» с цифровой камерой Digital Camera DSM-900 и программным обеспечением «Видео Тест-Морфология 5.2» [3].

¹ ГОСТ Р 52249-2009. Правила производства и контроля качества лекарственных средств.

Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики».

Таблица 1. Характеристика морфометрических показателей клеток чумного микроба штамма EV до и после концентрирования ($X \pm I_{95}$, $n = 5$)

Table 1. Morphometric parameters of plague microbe cells, EV strain, before and after concentration ($X \pm I_{95}$, $n = 5$)

Исследуемая культура	Содержание клеток..., %		Линейные размеры клеток, мкм		
	живых	делящихся	длина	диаметр	
Микробная культура, выращенная в реакторе БИОР-0,25	94,8 ± 1,7	7,0 ± 3,9	1,81 ± 0,09	0,75 ± 0,04	
Микробная суспензия, полученная по технологии...	оптимизированной	90,5 ± 4,5	4,2 ± 2,6	1,75 ± 0,10	0,68 ± 0,03
	регламентной	83,1 ± 3,3	4,3 ± 2,2	1,78 ± 0,12	0,73 ± 0,04

В сравнительной оценке параметров окислительного метаболизма чумного микроба штамма EV в процессе получения концентрированной микробной суспензии различными способами использовали хроноамперометрический метод измерения скорости дыхания и методику регистрации дыхания бактерий [6].

Физико-химические и иммунобиологические свойства вакцины чумной живой сухой определяли в соответствии с ФС.3.3.1.0022.15 Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, кожного скарификационного нанесения и ингаляций².

Материальный баланс стадии приготовления концентрированной микробной суспензии до и после оптимизации определяли в соответствии с требованиями ОСТ 64-02-003-2002³. Расчет проводили согласно методике, представленной в практике по технологии лекарственных форм [7].

При статистической обработке экспериментальных результатов использовали метод регрессивного анализа. Достоверность результатов оценивали по критерию Стьюдента⁴. Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Процесс концентрирования глубинной культуры вакцинного штамма EV чумного микроба согласно промышленному регламенту включает следующие технологические операции:

- предварительное осаждение в биореакторе БИОР-0,25 продолжительностью 6 ч;
- отбор накопленного осадка и седиментацию в емкости промежуточного хранения в течение 8 ч при температуре от 4 до 8 °С;
- концентрирование осадка микробной взвеси на протяжении 4 ч способом микрофильтрации на установке АСФ-009.

Последняя оснащалась пятью мембранными модулями из полипропилена с размером пор 0,2 мкм и площадью поверхности фильтрации 0,1 м² каждый. Разделение проводили в температурном интервале от 18 до 20 °С, при этом общая концентрация чумных микробов штамма EV в суспензии, определенная по отраслевому стандартному образцу мутности бактериальных взвесей 10 международных единиц (МЕ), эквивалентной 0,95·10⁹ м.кл./мл чумного микроба, составляла 120 млрд м.кл./мл.

Оптимизация процесса концентрирования заключалась во внедрении в производство вакцины установки АСФ-020. Ее конструктивные особенности позволили осуществлять мембранную фильтрацию, используя в качестве емкости промежуточного хранения реактор БИОР-0,25. Для микрофильтрации с применением установки АСФ-020 были выбраны 7 мембран-

ных модулей из полиэфирсульфона с размером пор 0,2 мкм. Общая площадь фильтрующей поверхности составляла 4,9 м². Процесс продолжался не более 4 ч при температуре от 15 до 18 °С. Общая концентрация микробов в суспензии составляла не менее 120 млрд м.кл./мл.

Движущей силой при тангенциальной фильтрации микробной суспензии в мембранной технике является перепад давлений, который создается насосными агрегатами. Так, на установке АСФ-009 используется перистальтический насос, а установка АСФ-020 оснащена высокопроизводительным герметичным центробежным насосом. Различие в конструкциях насосных устройств изменяет режимы течения микробной суспензии в рабочих полостях фильтрующих установок от ламинарного до турбулентного. Следует также учитывать, что гидродинамические характеристики мембранного оборудования способны оказывать как физическое, так и механическое воздействие на микробные клетки и влиять на их жизнеспособность в процессе переработки.

В этой связи дальнейшие исследования целесообразно было направить на сравнительное изучение влияния конструктивных особенностей мембранных установок на показатели, характеризующие качество полуфабрикатов и готовых препаратов. В микробных культурах оценивали содержание клеток (живых и делящихся) и анализировали параметры их линейных размеров. Для определения морфологических показателей чумного микроба штамма EV использовали микроскопические методы исследований [3, 8]. Полученные результаты приведены в таблице 1.

Данные, представленные в таблице 1, показывают, что содержание живых и делящихся микробных клеток при глубинном культивировании несколько выше, чем в микробном концентрате. Этот факт объясняется дефицитом питательного субстрата, возникшим в результате концентрирования клеток способом микрофильтрации [3, 8]. Содержание живых клеток в микробных суспензиях оставалось достаточно высоким и практически не зависело от метода концентрирования. Линейные размеры микробных клеток также оказались несколько большими в нативной культуре, но достоверно не отличались от размеров клеток в концентрированных микробных суспензиях. Такое уменьшение геометрических параметров клеток чумного микроба объясняется отсутствием питательных веществ в суспензии, а также применением микрофильтрационного механизма регуляции размеров, что можно назвать адаптацией микробной популяции к изменившимся условиям⁵.

Важным является исследование физиологического состояния бактериальных культур, поскольку это позволяет получать более полные данные об изменении состояния клеток под

² Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

³ ОСТ 64-02-003-2002. Продукция медицинской промышленности. Технологические регламенты производства. Содержание, порядок работ, согласования и утверждения.

⁴ Лакин Г.Ф. Биометрия. Учебное пособие. М.: Высшая школа; 1990.

⁵ Фихман БА. Микробиологическая рефрактометрия. М.: Медицина; 1967.

Таблица 2. Результаты сравнительной оценки показателей окислительного метаболизма чумного микроба штамма EV
Table 2. The results of comparison of oxidative metabolism parameters of the plague microbe, EV strain

Исследуемый показатель	Глубинная культура, выращенная в аппарате	Микробная суспензия, полученная по технологии...	
		оптимизированной	регламентной
Удельная скорость эндогенного дыхания, нМО ₂ (млрд·мин) ⁻¹	14,81	14,21	14,14
Коэффициент стимуляции дыхания глюкозой 0,0025 М, отн. ед.	1,00	1,00	1,00
Коэффициент стимуляции дыхания глюкозой 0,1 М, отн. ед.	1,00	1,00	1,00
Коэффициент стимуляции дыхания 2,4-динитрофенолом, отн. ед.	1,21	1,21	1,20

Примечание. В таблице представлены данные средней величины трех измерений.

Таблица 3. Характеристика основных показателей качества образцов вакцины чумной живой сухой
Table 3. Data on the main quality parameters of dry live plague vaccine samples

Наименование показателя качества, единица измерения	Требования нормативной документации	Результаты оценки вакцины, полученной по технологии...			
		регламентной		оптимизированной	
		на момент приготовления	по истечении срока годности (3 года)	на момент приготовления	по истечении срока годности (3 года)
Концентрация микробных клеток, млрд м.кл./мл	От 50 до 100	80	70	90	80
Концентрация живых микробных клеток, % от общей концентрации микробных клеток	25, не менее	29,2	25,5	34,6	30,7
Иммуногенность	Вакцина должна быть иммуногенной	Вакцина иммуногенна			
Потеря в массе при высушивании, %	4,0, не более	3,5	3,5	3,4	3,4
Термостабильность, сут	4,0, не менее	6,4	6,1	7,7	7,3
Концентрация микробных клеток, млрд м.кл./мл	От 50 до 100	80	70	90	80
Концентрация живых микробных клеток, % от общей концентрации микробных клеток	25, не менее	29,2	25,5	34,6	30,7
Иммуногенность	Вакцина должна быть иммуногенной	Вакцина иммуногенна			
Потеря в массе при высушивании, %	4,0, не более	3,5	3,5	3,4	3,4
Термостабильность, сут	4,0, не менее	6,4	6,1	7,7	7,3

Примечание. В таблице представлены данные средней величины трех измерений.

воздействием стрессовых факторов на последующих этапах технологии вакцины чумной живой.

Для изучения метаболической активности клеток и физиологического состояния культур чумного микроба использовали хроноамперометрический метод измерения скорости дыхания и методику регистрации дыхания бактерий, позволяющие провести сравнительную оценку параметров окислительного метаболизма чумного микроба штамма EV в процессе получения концентрированной микробной суспензии [6]. Результаты эксперимента представлены в таблице 2.

Анализ данных, представленных в таблице 2, показывает, что уровни окислительного метаболизма бактерий в составе нативных культур и концентрированных суспензий не имеют существенных различий.

На последнем этапе экспериментальной работы нами были приготовлены образцы лиофилизированной вакцины чумной

живой и проведена сравнительная оценка показателей качества препаратов на соответствие требованиям нормативной документации⁶. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 3.

Из данных, представленных в таблице 3, следует, что лиофилизированная вакцина чумная живая, произведенная по оптимизированной технологии (на установке АСФ-020), отвечает требованиям нормативной документации и сохраняет свои свойства по истечении срока годности (3 года). В равной степени отвечает всем характеристикам качества вакцина, приготовленная по регламенту. Однако препарат, полученный по оптимизированной технологии, имеет более высокие показатели по содержанию живых микробов и термостабильности.

К одной из наиболее значимых характеристик любого производства, позволяющей оценить эффективность технологии

⁶ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Таблица 4. Результаты сравнительной оценки материального баланса на этапе приготовления концентрированной микробной суспензии в технологии чумной вакцины с использованием различных методов концентрирования

Table 4. The results of comparative assessment of the mass balance at the stage of preparation of a concentrated microbial suspension during plague vaccine production using various methods of concentration

Наименование технологии концентрирования, продолжительность	Нативная культура				Концентрированная микробная суспензия				Фильтрат				Потери микробной культуры		Суммарные потери на стадии, %	Выход полуфабриката на стадии, %
	Объем, л	Концентрация клеток, м.кл./мл	Общее количество клеток	Исходное содержание клеток, %	Объем, л	Концентрация клеток, м.кл./мл	Общее количество клеток	Содержание клеток от исходного, %	Объем, л	Концентрация клеток, м.кл./мл	Общее количество клеток	Содержание клеток от исходного, %	В коммуникациях, %	Проба на лабораторный контроль, %		
Регламентный, 18 ч	175,0	25,0·10 ⁹	437,5·10 ¹³	100	10,0	12,0·10 ¹⁰	120,0·10 ¹³	27,4	165,0	17,6·10 ⁹	291,2·10 ¹²	66,6	3,6	2,4	72,6	27,4
Оптимизированный, 4 ч					30,0	12,0·10 ¹⁰	360,0·10 ¹³	82,3	145,0	-	-	-	15,3	2,4	17,7	82,3

Примечание. «-» — микробные клетки отсутствуют.

как в целом, так и по отдельным стадиям, является материальным балансом.

Результаты сравнительной оценки материального баланса на этапе приготовления концентрированной микробной суспензии в технологии чумной вакцины с использованием различных технологий представлены в таблице 4. Из расчетно-экспериментальных данных (табл. 4) следует, что объем концентрата чумного микроба штамма EV достигал величины 0,17 л с 1 л нативной культуры по оптимизированной технологии и в 3 раза превышал объем микробной суспензии, полученной согласно регламенту, а продолжительность процесса сократилась до 4 ч.

Таким образом, в ходе проведенных исследований оптимизирован процесс концентрирования микробных клеток в технологическом процессе производства чумных вакцин. Сравнительное изучение морфометрических и физиологических свойств культур чумного микроба *Y. pestis* EV в процессе их концентрирования по оптимизированной и регламентной технологиям не выявило существенных отличий. Показано, что вакцинные препараты, приготовленные из концентратов микробных клеток, полученных на установке микрофилтрации АСФ-020, удовлетворяют требованиям нормативной документации и сохраняют свои свойства по истечении срока годности⁷. При этом они имели более высокие показатели по содержанию живых микробов и термостабильности. Оптимизация процесса концентрирования позволила увеличить выход микробной взвеси с единицы объема нативной культуры чумного микроба на 33,3 % и сократить продолжительность технологической стадии в 4,5 раза.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания филиалу Федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (Киров) № 707 ОК/2013/ДРГЗ от 27.09.2013 г. на проведение опытно-конструкторской работы «Создание автоматизированной информационной системы контроля производства медицинских иммунобиологических препаратов», шифр «Выпь-1».

Acknowledgements. The study was carried out by the local office of the Federal State Budgetary Institution «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation (Kirov) as part of the publicly funded experimental engineering project No. 707 ОК/2013/DRGZ initiated on 27.09.2013 «Creation of an automated information system for monitoring the production of medicinal immunobiological products», project code «Vyp-1».

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. Микшис НИ, Кудрявцева ОМ, Кутырев ВВ. Современные тенденции в конструировании рекомбинантных вакцин для специфической профилактики чумы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2015;(3):116–26. [Mikshis NI, Kudryavtseva OM, Kutyrev VV. Contemporary tendencies in constructing recombinant vaccines for specific prophylaxis of plague. *Zhurnal mikrobiologii, ehpidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology*. 2015;(3):116–26 (In Russ.)]
2. Бирюков ВВ. *Основы промышленной биотехнологии*. М.: КолосС Химия; 2004. [Biryukov VV. *Fundamentals of Industrial Biotechnology*. М.: KolosS Khimiya; 2004 (In Russ.)]
3. Ежов АВ, Садовой ИН, Бирюков ВВ, Мохов ДА, Багин СВ, Чернышев АВ и др. Возможность использования метода микрофилтрации в технологии вакцины чумной живой сухой. *Материалы Всероссийской научной конференции, посвященной 80-летию со дня основания ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России»*. Киров: ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России», 2008. Вып. 1. С. 313–6. [Ezhov AV, Sadovoy IN, Biryukov VV, Mokhov DA, Bagin SV, Chernyadyev AV, et al. The possibility of using the microfiltration method in the plague live dry vaccine technology. *Proceedings of the All-Russian scientific conference devoted to the 80th anniversary of the founding of the Federal State Research Institute of the 48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of*

⁷ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

- Russia. Kirov: FSI «48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of Russia», 2008. Issue 1. P. 313–6 (In Russ.)]
- Тетерин ВВ, Ежов АВ, Бирюков ВВ, Мохов ДА, Багин СВ, Хонин АЗ, Логвинов СВ. Способ получения препарата на основе вакцинного штамма чумного микроба. Патент Российской Федерации № 2510825; 2014. [Teterin VV, Ezhov AV, Biryukov VV, Mokhov DA, Bagin SV, Khonin AZ, Logviov SV. Method of obtaining preparation based on vaccine strain of plague microbe. Patent of the Russian Federation No. 2510825; 2014 (In Russ.)]
 - Загоскина НВ, Назаренко ЛВ, Калашникова ЕА, Живухина ЕА. Биотехнология: теория и практика. М.: Оникс; 2009. [Zagoskina NV, Nazarenko LV, Kalashnikova EA, Zhivukhina EA. *Biotechnology: theory and practice*. Moscow: Онух; 2009 (In Russ.)]
 - Мартынов НВ, Чеботарев ЕВ, Лебединский ВА, Чичерин ЮВ, Додонов НП, Нестеренко АА. Полярографический метод в оценке культуральных свойств вакцинного штамма EB. *Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии*. 1990;(12):18–21. [Martynov NV, Chebotarev YeV, Lebedinskiy VA, Chicherin YuV, Dodonov NP, Nesterenko AA. Polarographic method in assessing the cultural properties of the vaccine strain EB. *Zhurnal mikrobiologii, ehpidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology*. 1990;(12):18–21 (In Russ.)]
 - Краснюк ИИ, Михайлова ГВ, ред. *Практикум по технологии лекарственных форм*. М.: Академия; 2007. [Krasnyuk II, Mikhaylova GV., *Practice on the technology of medicinal forms*. M.: Academy; 2007 (In Russ.)]
 - Лещенко АА, Тетерин ВВ, Лазыкин АГ, Ежов АВ, Мохов ДА, Бирюков ВВ и др. Экспериментальное обоснование возможности получения концентрата микробных клеток штамма *Yersinia pestis* EV методом микрофилтрации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2014;(1):31–5. [Leshchenko AA, Teterin VV, Lazykin AG, Ezhov AV, Mokhov DA, Biryukov VV, et al. Experimental justification of the possibility of obtaining microbial *Yersinia pestis* EV strain concentrate by microfiltration. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lecheniye = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2014;(1):31–5 (In Russ.)]

Об авторах

Шаров Дмитрий Александрович, канд. техн. наук, начальник научно-исследовательского отдела филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров)

Лещенко Андрей Анатольевич, д-р техн. наук, профессор, ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров)

Багин Сергей Валерьевич, канд. техн. наук, научный сотрудник научно-исследовательского отдела филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров)

Мохов Дмитрий Александрович, канд. биол. наук, научный сотрудник научно-исследовательского отдела филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров)

Логвинов Сергей Владимирович, канд. биол. наук, научный сотрудник научно-исследовательского отдела филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров)

Крупин Владимир Викторович, канд. биол. наук, заместитель начальника научно-исследовательского отдела филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров)

Ежов Андрей Владимирович, д-р мед. наук, старший научный сотрудник, старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров)

Лазыкин Алексей Геннадьевич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров)

Бирюков Василий Васильевич, канд. техн. наук, начальник научно-исследовательского отдела филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров)

Authors

Dmitry A. Sharov, Candidate of Technical Sciences, Head of the Research Department of the Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov)

Andrey A. Leshchenko, Doctor of Technical Sciences, Professor, Leading Researcher of the Research Department of the Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov)

Sergey V. Bagin, Candidate of Technical Sciences, Researcher of the Research Department of the Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov)

Dmitry A. Mokhov, Candidate of Biological Sciences, Researcher of the Research Department of the Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov)

Sergey V. Logvinov, Candidate of Biological Sciences, Researcher of the Research Department of the Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov)

Vladimir V. Krupin, Candidate of Biological Sciences, Deputy Head of the Research Department of the Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov)

Andrey V. Ezhov, Doctor of Medical Sciences, Senior Research Associate, Senior Researcher of the Research Department of the Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov)

Aleksey G. Lazykin, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of the Research Department of the Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov)

Vasily V. Biryukov, Candidate of Technical Sciences, Head of the Research Department of the Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov)

Поступила 06.12.2018
После доработки 29.01.2019
Принята к публикации 14.02.2019

Received 6 December 2018
Revised 29 January 2019
Accepted 14 February 2019

Особенности стандартизации туберкулиновых препаратов

Н. В. Александрова*, Д. Т. Леви, А. В. Наконечная, А. А. Савина

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

Согласно существующей в мире практике референс-материалы для оценки специфической активности препаратов очищенного туберкулина изготавливают из расчета использования в течение нескольких десятилетий, что предполагает их высокую стабильность. Так, туберкулин PPD-S, изготовленный в США в 1944 г., используется для международного стандарта очищенного туберкулина до настоящего времени в виде лиофилизатов в ампулах (PPDT), содержащих 5000 IU каждая. Материал для отечественного стандартного образца очищенного туберкулина ОСО ППД-Л-2 получен в 1973 г. в Ленинградском НИИВС. Многолетнее применение этой субстанции для контроля производственных серий очищенного туберкулина ППД-Л обусловлено высокой стабильностью показателя специфической активности ОСО ППД-Л-2, что должно периодически подтверждаться в широкомасштабном исследовании на различных экспериментальных моделях в соответствии с требованиями Всемирной организации здравоохранения.

Цель работы: оценить долгосрочную стабильность субстанции отраслевого стандартного образца очищенного туберкулина (ОСО ППД-Л-2) путем подтверждения его специфической активности относительно международного стандарта очищенного туберкулина и определить возможность использования этой субстанции для приготовления лиофилизированных образцов референс-препарата. **Материалы и методы:** специфическую активность ОСО ППД-Л-2 определяли относительно международного стандарта PPDT в соответствии с методикой, указанной в ФС.3.3.1.0023.15 Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания, используя морских свинок, вакцинированных различными субштаммами БЦЖ или сенсibilизированных вирулентными микобактериями («живыми» или «инактивированными») в соответствии с рекомендациями ВОЗ (WHO TRS 45, 1987). **Результаты:** анализ полученных данных позволил заключить, что величина показателя относительной активности ОСО ППД-Л-2 варьировала в 3–4 раза в зависимости от использованного для вакцинации морских свинок субштамма БЦЖ (модели сенсibilизации животных). Такое влияние модели титрования проявлялось при сравнении специфической активности туберкулинов, полученных различными методами осаждения туберкулопротеина (ППД-Л-2 и PPDT), т. е. отличающихся по составу антигенов. На животных, сенсibilизированных микобактериями туберкулеза, специфическая активность установленной ранее дозы ОСО ППД-Л-2 эквивалентна международному стандарту. **Выводы:** полученные в данном исследовании результаты оценки специфической активности ОСО ППД-Л-2 соответствуют данным, полученным при разработке и аттестации этого референс-материала в 1980-х гг., и подтверждают долгосрочную стабильность порошка-полуфабриката отечественного стандартного образца очищенного туберкулина. В то же время получение лиофилизированной формы ОСО, помимо экономической целесообразности, исключило бы определенное количество возможных ошибок, которые неизбежны при выполнении ежегодной процедуры приготовления и контроля разведений субстанции, и позволило бы сохранить ее количество, что увеличивает перспективы дальнейшего многолетнего использования ППД-Л-2 в качестве отраслевого стандартного образца.

Ключевые слова: туберкулин; отраслевой стандартный образец (ППД-Л-2); туберкулиновая единица (ТЕ, IU, TU); международный стандарт очищенного туберкулина (PPDS, PPDT); специфическая активность; сенсibilизация

Для цитирования: Александрова НВ, Леви ДТ, Наконечная АВ, Савина АА. Особенности стандартизации туберкулиновых препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2019;19(1):56–63. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-56-63>

Контактное лицо: Александрова Наталья Владимировна; AleksandrovaNV@expmed.ru

Specific Aspects of Tuberculin Products Standardisation

N. V. Aleksandrova*, D. T. Levi, A. V. Nakonechnaya, A. A. Savina

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

According to the existing international practice, reference materials, which are used to assess specific activity of purified tuberculin products, are meant to be used for several decades and are therefore characterised by high stability. For instance, PPD-S tuberculin produced in the USA in 1944 has been used ever since as the international reference standard of purified tuberculin and is stored as lyophilisate in ampoules (PPDT) containing 5000 IU each. The Russian PPD-L-2 industry reference standard is made from material produced by the Leningrad Research Institute of Vaccines and Sera in 1973. It has been used for many years to control production batches of PPD-L purified tuberculin because of its high stability that is regularly confirmed in large-scale studies using various experimental models in accordance with the requirements of the World Health Organisation. **The aim of**

the study was to evaluate the long-term stability of the substance of industry reference standard of purified tuberculin (PPD-L-2 IRS) by determining its specific activity relative to the international standard of purified tuberculin, and determine the feasibility of using this substance for the preparation of lyophilised reference product samples.

Materials and methods: PPD-L-2 IRS specific activity was determined relative to the PPDT international standard in accordance with the procedure specified in the monograph FS.3.3.1.0023.15 of the State Pharmacopoeia of Russian Federation (14 edition) using guinea pigs vaccinated with various BCG substrains or sensitized by virulent mycobacteria («live» or «inactivated») in accordance with the recommendations of the WHO (WHO TRS 45, 1987). **Results:** the analysis of the obtained data showed that there were 3–4-fold differences in PPD-L-2 IRS relative potency depending on the BCG substrain used for guinea pigs vaccination (animal sensitization model). This effect of the titration model manifested itself when comparing specific activity of tuberculins obtained by various methods of tuberculo-protein precipitation (PPD-L-2 and PPDT), i.e. different in antigen composition. The specific activity of the previously established dose of PPD-L-2 IRS was shown to be equivalent to the international reference standard in animals sensitized with mycobacteria tuberculosis. **Conclusions:** the results of PPD-L-2 IRS specific activity assessment obtained in this study are consistent with the data obtained during development and certification of this reference material in the 1980s and confirm the long-term stability of the intermediate powder product of the Russian reference standard of purified tuberculin. At the same time, the production of a freeze-dried form of the IRS, in addition to being economically feasible, would rule out some potential errors that are inevitable during annual preparation and control of the reference standard dilutions, and would make it possible to spare the substance which would improve prospects for the future long-term use of PPD-L as an industry reference standard.

Key words: tuberculin; industry reference standard (PPD-L-2); tuberculin unit (TU, IU); international reference standard of purified tuberculin (PPDS, PPDT); specific activity; sensitization

For citation: Aleksandrova NV, Levi DT, Nakonechnaya AV, Savina AA. Specific aspects of tuberculin products standardisation. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(1):56–63. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-56-63>

*Corresponding author: Natalia V. Aleksandrova; AleksandrovaNV@expmed.ru

Несмотря на значительные усилия по предупреждению распространения туберкулеза и некоторые успехи в борьбе с эпидемией этой инфекции, туберкулез продолжает оставаться глобальной проблемой здравоохранения во всем мире. Принятая туберкулезным сообществом пятилетняя Программа борьбы с этой инфекцией Stop TB Partnership не принесла ожидаемых результатов. В новой программе, действующей с 2015 г. и подписанной главами многих государств, изложен комплекс мероприятий по борьбе с туберкулезом. В структуре базовых положений этого документа подчеркнута необходимость своевременной «ранней диагностики туберкулеза»¹. Одним из инструментов в решении указанной задачи в нашей стране является массовая туберкулинодиагностика (проба Манту) с аллергеном туберкулезным в стандартном разведении (туберкулин) у детей². Важным элементом массовых диагностических мероприятий является использование стандартных серий туберкулина, так как увеличение размера реакции на пробу Манту по сравнению с предыдущей реакцией так же, как и впервые выявленная положительная реакция, влечет за собой комплексное обследование ребенка на туберкулез. В связи с этим каждую серию туберкулина стандартизуют относительно аттестованного стандартного образца. Согласно рекомендации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ)³ национальные стандарты (стандартные образцы) очищенного туберкулина должны быть сопоставлены с международным стандартом.

F. Seibert с сотрудниками в 1939 г. разработали технологию получения очищенного туберкулина ППД (purified protein derivative, PPD) из культуральных фильтратов вирулентного штамма *Mycobacterium tuberculosis*. Туберкулопротеин был

осажден сульфатом аммония с дополнительной очисткой трихлоруксусной кислотой (ТХУ) и диализом. Этот метод очистки многократно снижал в препарате содержание полисахаридов, нуклеиновых кислот и липидов. В 1944 г. большая хорошо изученная серия очищенного туберкулина получила название PPD-S (S — Seibert) и была утверждена как стандартная серия для использования в США с целью диагностики туберкулеза. В 1952 г. часть партии этого туберкулина, названная PPDS, была принята ВОЗ в качестве международного стандарта специфической активности туберкулина [1]. Было установлено, что 1 IU (international unit, IU — международная единица) содержится в 0,028 мкг PPDS (0,02 мкг PPD и 0,008 мкг солей). В связи с истощением запасов PPDS в Датском институте сывороток (SSI) туберкулин из приготовленных F. Seibert «для специальных нужд» ампул PPDS восстановлен, разлит (доказана высокая точность розлива) по 5000 IU/ампула и лиофильно высушен⁴ [5]. После исследований, подтвердивших, что специфическая активность полученного лиофилизата эквивалентна активности PPDS, этот туберкулин в 1983 г. утвержден в качестве серии PPDT международного стандарта специфической активности очищенного туберкулина⁵. Таким образом, PPDT является все тем же туберкулином PPD-S, который получен F. Seibert в 1939–1944 гг.

В Ленинградском НИИВС в 1973 г. по модифицированному Линниковой методу изготовлена очередная партия субстанции (порошок-полуфабрикат) туберкулина ППД-Л (Л — Линниковой), предназначенная для второго национального стандарта очищенного туберкулина. При сопоставлении с первым национальным стандартом ППД-Л-1 (1 ТЕ которого содержалась в 0,06 мкг субстанции) на вакцинированных

¹ Шестидесят седьмая сессия Всемирной ассамблеи здравоохранения, Женева, 19–24 мая 2014 г.: резолюции и решения, приложения (WHA67/2014/REC/1). ВОЗ; 2014. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260353/A67_2014_REC1-ru.pdf?sequence=1&isAllowed=y

² Приказ Минздрава России от 29.12.2014 № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания».

³ WHO Expert Committee on Biological Standardization: forty-fifth report. WHO technical report series 858. WHO; 1995. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/36999/WHO_TRS_858.pdf?sequence=1

⁴ WHO BS 81.1306. Purified protein derivative of mammalian tuberculin.

⁵ International standard for purified protein derivative (PPD) of mammalian tuberculin (WHO/BS/83.1408). Expert committee on biological standardization. WHO; 1983. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/60229/WHO_BS_83.1408_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y

БЦЖ и на зараженных *Mycobacterium tuberculosis* морских свинок определена доза субстанции ППД-Л-2, содержащая 1 ТЕ. Она составляла 0,015 мкг. Эта доза явилась основой для приготовления разведений ППД-Л-2 с целью проведения испытаний его активности относительно международного стандарта PPDS на морских свинок, вакцинированных различными субштаммами БЦЖ.

По результатам аттестации ППД-Л-2 относительно международного стандарта PPDS на животных, зараженных *M. tuberculosis*, установлено, что эквивалент одной международной единицы PPDS составляет 0,000015–0,00002 мг ППД-Л-2 (величина показателя зависела от уровня сенсибилизации морских свинок). Полученные данные соответствовали результатам постановки проб с этими препаратами на больных туберкулезом людях [2]. В 1980 г. ППД-Л-2 утвержден в качестве второго национального стандарта очищенного туберкулина и в 1986 г. внесен в Реестр отраслевых стандартных образцов, допущенных к применению в системе здравоохранения СССР и на предприятиях других ведомств, выпускающих иммунобиологические лекарственные препараты. В настоящее время согласно отечественным требованиям наименование «национальный стандарт ППД-Л-2» заменено на «отраслевой стандартный образец — ОСО ППД-Л-2 42-28-49».

Цель работы — оценить долгосрочную стабильность субстанции отраслевого стандартного образца очищенного туберкулина (ОСО ППД-Л-2) путем подтверждения его специфической активности относительно международного стандарта очищенного туберкулина и определить возможность использования этой субстанции для приготовления лиофилизированных образцов референс-препарата.

Задачей данного исследования является аттестация специфической активности ОСО ППД-Л-2 относительно международного стандарта очищенного туберкулина PPDT на различных моделях сенсибилизации животных с целью подтверждения долгосрочной стабильности ОСО.

Материалы и методы

Материалы

1. Международный стандарт очищенного туберкулина из *M. tuberculosis* (In. st. for Purified Protein Derivative (PPD) of *M. tuberculosis* Tuberculin 5.000 IU/ampoule (код NIBSC: PPDT, далее PPDT)).

2. Отраслевой стандартный образец очищенного туберкулина — ОСО ППД-Л-2 42-28-49 (далее ОСО ППД-Л-2 или ОСО).

3. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 1/47 и 102 (№ 700403 и 700403f соответственно, ГКПМ ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), лиофилизат.

4. Субштаммы *M. bovis* BCG.

4.1. Лиофилизат субштамма вакцины туберкулезной БЦЖ, Россия (BCG Vaccine of Russia BCG-1 sub-strain (1st WHO Reference Reagent)) International Reference Reagent (далее — BCG-1);

4.2. Лиофилизат субштамма вакцины туберкулезной БЦЖ, Япония (BCG Vaccine of Tokyo 172 sub-strain (1st WHO Reference Reagent)) International Reference Reagent (далее — BCG Tokyo);

4.3. Лиофилизат субштамма вакцины туберкулезной БЦЖ, Дания (BCG Vaccine of Danish 1331 sub-strain (1st WHO Reference Reagent)) International Reference Reagent (далее — BCG Danish).

5. Питательной средой для культивирования служила яичная среда Левенштейна–Йенсена.

⁶ СП 2.2.1.3218-14 от 29 августа 2014 г. № 51 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

6. Фосфатно-буферный раствор (ФБР), pH 7,38 с 0,02 % хинозола.

7. Хинозол: 8-оксихинолин (антимикробный агент).

8. Неполный адъювант Фрейнда (НАФ) (Dropper adjuvant incomplete Freund, USA).

9. Животные: морские свинки массой 300–350 г (масса указана на момент сенсибилизации) белокожие или альбиносы из питомника, филиал Андреевка, ФГБУ «НЦБМТ» ФМБА России.

Животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими требованиями к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) 2014 г.⁶

Методы

Морских свинок делили по методу случайной выборки на группы (по 6 или кратное 6 количество животных в группе).

1. Сенсибилизация групп животных.

1.1. Вакцина БЦЖ: 16–20-дневная культура 2-й генерации используемого субштамма БЦЖ с поверхности среды Левенштейна–Йенсена (полувлажный вес), разведенная 0,9 % раствором натрия хлорида с НАФ (1:1) до содержания 0,5 мг в 0,2 мл препарата, внутрикожно по 0,1 мл в 2 места в область живота);

1.2. Инактивированная нагреванием (90 °С, 40 мин) разведенная 0,9 % раствором натрия хлорида с НАФ (1:1) 20-дневная культура 3-й генерации *M. tuberculosis* H37Rv 1/47 со среды Левенштейна–Йенсена (5 мг/мл), внутрикожно по 0,1 мл в 2 места в область живота.

1.3. Заражение.

а) *M. tuberculosis* H37Rv 1/47, 20-дневная культура 3-й генерации со среды Левенштейна–Йенсена, внутрибрюшинно (по 0,0002 мг в 0,2 мл);

б) *M. tuberculosis* H37Rv 102, 20-дневная культура 3-й генерации со среды Левенштейна–Йенсена, внутрибрюшинно (по 0,002 мг в 0,2 мл).

2. Определение (титрование) активности ППД-Л-2 относительно международного стандарта PPDT.

Для проведения испытания готовили разведения туберкулинов, используя ФБР:

- схема А: международный стандарт разводили до содержания 2, 10 и 50 IU в 0,1 мл, а ОСО ППД-Л-2 — до 2, 10 и 50 ТЕ в 0,1 мл;

- схема Б: PPDT разводили до содержания 5, 25 и 125 IU в 0,1 мл, а ОСО соответственно — до 5, 25 и 125 ТЕ в 0,1 мл.

Каждому животному группы из 6 морских свинок вводили внутрикожно по 0,1 мл методом случайной выборки:

- по три разведения (схема А или Б) двух сравниваемых туберкулинов;

- или по 4 пробы: 2 ТЕ и 2 IU сравниваемых туберкулинов;

- или по 4 пробы: 5 ТЕ и 5 IU сравниваемых туберкулинов.

3. Учет ответных реакций осуществляли через 24 ч два специалиста независимо друг от друга, измеряя 2 поперечных диаметра папулы (эритемы). Полученные данные усредняли, подсчитывали средний диаметр реакции на каждое разведение препарата и ошибки средних. При этом за испытуемый препарат всегда принимали ОСО ППД-Л-2, за стандарт — международный стандарт PPDT.

Статистический анализ результатов определения относительной активности (*R*) основан на линейном характере зависимости «lg доза–эффект» и методике «параллельных линий».

Таблица 1. Результаты оценки относительной активности ППД-Л-2/ PPDT на морских свинках, вакцинированных различными субштаммами *M. bovis* BCG (5, 25 и 125 TE / 5, 25 и 125 IU)
Table 1. The results of PPD-L-2/PPDT relative potency evaluation in guinea pigs vaccinated with different substrains of *M. bovis* BCG (5, 25 and 125 TU of PPD-L-2 IRS / 5, 25 and 125 IU of PPDT)

Сенсибилизация (субштамм вакцинации)	Средние реакции на дозу ППД-Л-2, мм			Средние реакции на дозу PPDT, мм			<i>b</i>	<i>R±m</i>
	5 TE	25 TE	125 TE	5 IU	25 IU	125 IU		
BCG-1	10,2	13,4	16,8	7,7	11,3	14,6	4,81	3,00 ± 0,07
BCG Tokyo	12,2	15,3	17,5	10,6	12,8	16,5	4,01	2,58 ± 0,13
BCG Danish	7,8	12,5	14,9	7,7	12,2	16,3	5,65	0,88 ± 0,09

Примечание. *b* — тангенс угла наклона прямых зависимости «доза-эффект», *R* — показатель относительной активности, *m* — ошибка средней.

По формуле:
$$\bar{d} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N d_i, \quad (1)$$

где *N* — число точек на дозу, *d_i* — отдельный диаметр реакции на определенную дозу, вычисляли средние диаметры папул (эритем) (\bar{d}) на каждое разведение ОСО и PPDT и среднее квадратичное отклонение (*σ*):

$$\sigma_i = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\bar{d} - d_i)^2}{N - 1}}. \quad (2)$$

По формуле
$$b = \frac{(\bar{d}_{\max}^{PPDT} - \bar{d}_{\min}^{PPDT}) + (\bar{d}_{\max}^{OSO} - \bar{d}_{\min}^{OSO})}{2(\lg D_{\max} - \lg D_{\min})}, \quad (3)$$

где \bar{d}_{\max} и \bar{d}_{\min} — средние диаметры реакций на максимальную (D_{\max}) и минимальную (D_{\min}) дозу PPDT или ОСО, вычисляли средний тангенс угла наклона прямых зависимости «доза-эффект» (*b*).

По формуле:

$$\lg R = \frac{(\bar{d}_{5TE}^{OSO} - \bar{d}_{5TE}^{PPDT}) + (\bar{d}_{25TE}^{OSO} - \bar{d}_{25TE}^{PPDT}) + (\bar{d}_{125TE}^{OSO} - \bar{d}_{125TE}^{PPDT})}{bK}, \quad (4)$$

где *K* — число слагаемых в числителе, определяли логарифм относительной активности (*lgR*). Относительная активность *R* равна $10^{\lg R}$. Таким же образом подсчитывали *lgR* при сравнении разведений туберкулинов до содержания 2, 10 и 50 туберкулиновых единиц в 0,1 мл буферного раствора.

Используя формулы $\bar{\sigma} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \sigma_i$ (5) и $m_{\lg R} = \frac{\bar{\sigma}}{b \sqrt{K \frac{N_0}{2}}}$, (6)

где N_0 — количество животных в опыте; *n* — число средних (квадратичных отклонений), подсчитывали среднее квадратичное отклонение и стандартную ошибку для всего опыта. За доверительные границы принимали ± 2 стандартные ошибки ($m_{\lg R}$). Специфическую активность двух туберкулинов в соответствии с ФС.3.3.1.0023.15⁷ на аллерген туберкулезный считают равной, если показатель относительной активности *R* равен (1 ± 0,2) с вероятностью 95 %.

При сопоставлении 2 или 5 TE ОСО ППД-Л-2 с соответствующими дозами PPDT (2 или 5 IU) оценку результатов проводили по индексу (*I*) специфической активности. Индекс специфической активности определяли как частное от деления среднего размера реакции на ОСО к среднему размеру реакции на аналогичную дозу PPDT. Средние реакции (\bar{d}) подсчитывали по формуле (1), а стандартное отклонение (*σ*) по формуле (2).

Ошибку средней определяли по формуле:
$$m = \sqrt{\frac{\sigma^2}{n}}, \quad (7)$$

где *n* — общее число проб, *σ* — стандартное отклонение. Специфическую активность ОСО считали равной этому показателю для стандарта, если индекс специфической активности ОСО равен 1 ± 0,05.

Результаты

В таблице 1 представлены результаты сопоставления специфической активности разведений ОСО ППД-Л-2 с активностью международного стандарта PPDT на морских свинках, сенсибилизированных субштаммом BCG-1, BCG-Tokyo или BCG-Danish.

На основании полученных результатов установлено, что показатель специфической активности ОСО ППД-Л-2 относительно международного стандарта значительно варьирует в зависимости от модели — субштамма БЦЖ, которым сенсибилизированы морские свинки. Так, при контроле относительной активности ОСО ППД-Л-2 на животных, вакцинированных датским субштаммом БЦЖ, специфическая активность ОСО ППД-Л-2 была равна специфической активности международного стандарта PPDT (*R* = 0,88). При вакцинации животных российским субштаммом БЦЖ показатель *R* относительной активности ОСО ППД-Л-2 был равен 3,0, т. е. почти в 3,5 раза превышал показатель, установленный на животных, сенсибилизированных датским субштаммом. Морские свинки, вакцинированные японским субштаммом, так же как животные, сенсибилизированные российским субштаммом, отвечали на ОСО ППД-Л-2 большими размерами реакций, чем на международный стандарт PPDT. Показатель относительной активности ОСО ППД-Л-2 был равен 2,58, что почти в 3 раза выше показателя, полученного на животных, вакцинированных датским субштаммом БЦЖ (*p* < 0,05).

В таблице 2 представлены результаты, полученные в опыте аналогичного дизайна, но при использовании для постановки внутрикожных проб меньших доз сравниваемых туберкулинов: 2, 10 и 50 TE ОСО ППД-Л-2 относительно 2, 10 и 50 IU PPDT.

Анализ полученных данных показал, что при сопоставлении туберкулинов PPD, полученных различными методами осаждения туберкулопротеина, результаты испытаний могут зависеть от выбранных для сравнения доз препаратов. Различия по показателям относительной активности препарата при сопоставлении сниженных доз сравниваемых туберкулинов на тех же моделях сенсибилизации животных были не столь значимыми. При этом на животных, вакцинированных датским субштаммом BCG, реакции на ОСО ППД-Л-2 тоже

⁷ Фармакопейная статья 3.3.1.0023.15 Туберкулин очищенный (ППД) (аллерген туберкулезный очищенный). Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Таблица 2. Результаты оценки относительной активности ППД-Л-2/PPDT на морских свинках, вакцинированных различными субштаммами *M. bovis* BCG (2, 10 и 50 ТЕ ОСО ППД-Л-2 / 2, 10 и 50 IU PPDT)

Table 2. The results of PPD-L-2/PPDT relative potency evaluation in guinea pigs vaccinated with different substrains of *M. bovis* BCG (2, 10 and 50 TU of PPD-L-2 IRS / 2, 10 and 50 IU of PPDT)

Сенсибилизация (субштамм вакцинации)	Средние реакции на дозу ППД-Л-2, мм			Средние реакции на дозу PPDT, мм			<i>b</i>	<i>R±m</i>
	2 TE	10 TE	50 TE	2 IU	10 IU	50 IU		
BCG-1	10,2	13,7	17,1	8,8	12,9	16,2	5,16	1,60 ± 0,08
BCG Tokyo	9,7	13,9	18	9,5	12,9	16,8	5,57	1,42 ± 0,08
BCG Danish	9,1	13,6	16,4	8,3	12,6	15,5	5,16	1,50 ± 0,07

Примечание. *b* — тангенс угла наклона прямых зависимости «доза–эффект», *R* — показатель относительной активности, *m* — ошибка средней.

Таблица 3. Результаты оценки относительной активности разведений ОСО ППД-Л-2 на морских свинках, зараженных *M. tuberculosis* H37Rv

Table 3. The results of relative potency evaluation of PPD-L-2 IRS dilutions in guinea pigs infected with *M. tuberculosis* H37Rv

Сенсибилизация (заражение)		Средние реакции на дозу ППД-Л-2, мм			Средние реакции на дозу PPDT, мм			<i>b</i>	<i>R±m</i>
		5 TE	25 TE	125 TE	5 IU	25 IU	125 IU		
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 1/47, 0,0002 мг в/бр.	33 сут	9,3	12,8	17,1	10,2	13,7	16,7	5,16	0,81 ± 0,09
		9,1	12,9	16,2	10,4	13,0	16,3	4,65	0,79 ± 0,13
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 102, 0,002 мг в/бр.	42 сут	2 TE	10 TE	50 TE	2 IU	10 IU	50 IU	-	-
		9,7	13,3	16,9	10,5	14,2	16,5	4,73	0,80 ± 0,1

Примечание. *b* — тангенс угла наклона прямых зависимости «доза–эффект», *R* — показатель относительной активности, *m* — ошибка средней, в/бр. — внутрибрюшинное введение.

Таблица 4. Результаты оценки относительной активности разведений ОСО ППД-Л-2 на морских свинках, сенсибилизированных инактивированной культурой *M. tuberculosis*

Table 4. The results of relative potency evaluation of PPD-L-2 IRS dilutions in guinea pigs sensitized by inactivated *M. tuberculosis*

Сенсибилизация	Средние реакции на дозу ППД-Л-2, мм			Средние реакции на дозу, мм			<i>b</i>	<i>R±m</i>
	5 TE	25 TE	125 TE	5 IU	25 IU	125 IU		
Инактивированная культура <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	9,4	12,3	14,8	8,9	11,7	15,2	4,18	1,13 ± 0,13
	2 TE	10 TE	50 TE	2 IU	10 IU	50 IU	-	-
	7,0	12,4	16,2	6,4	11,4	15,4	6,52	1,32 ± 0,16

Примечание. *b* — тангенс угла наклона прямых зависимости «доза–эффект», *R* — показатель относительной активности, *m* — ошибка средней.

были статистически значимо выше, чем на PPDT. Полученные данные подтверждают, что не только состав туберкулинов, приготовленных с использованием разных технологических методов, штаммов и видов микобактерий, но и количественное содержание антигенов неодинаково. Это проявляется при сравнении разных разведений таких туберкулиновых препаратов.

В таблицах 3 и 4 приведены данные исследования специфической активности ОСО ППД-Л-2 относительно международного стандарта PPDT на животных, зараженных двумя дозами вирулентных *M. tuberculosis* или сенсибилизированных инактивированными микобактериями туберкулеза.

Анализ данных, представленных в таблицах 3 и 4, позволил установить, что специфическая активность ОСО в данной аранжировке опыта эквивалентна специфической активности международного стандарта туберкулина ($R = 0,8$). Показатель относительной активности ОСО ППД-Л-2 к международному стандарту при сопоставлении разведений 5, 25 и 125 ТЕ на морских свинках, зараженных дозой 0,0002 мг, и на животных, зараженных десятикратно большей дозой

(0,002 мг) *M. tuberculosis*, практически равны между собой ($R = 0,81 \pm 0,09$ и $R = 0,79 \pm 0,13$). Такие же результаты получены при сопоставлении ответных реакций на введение меньших доз (2, 10 и 50 ТЕ) сравниваемых туберкулинов ($p < 0,05$). В этом случае показатель относительной активности ($R = 0,80 \pm 0,1$) также находился на нижней границе допустимых колебаний ($R = 0,8-1,2$).

При проведении исследований на животных, сенсибилизированных инактивированными *M. tuberculosis* (табл. 4), реакции на разведения 5, 25 и 125 ТЕ туберкулина ППД-Л-2 были равны реакциям на аналогичные разведения международного стандарта PPDT, т. е. демонстрировали эквивалентную специфическую активность ($R = 1,13 \pm 0,13$).

В таблице 5 представлены результаты, полученные при сравнении реакций на введение исследуемых туберкулинов в разведении 2 или 5 ТЕ морским свинкам, вакцинированным российским субштаммом БЦЖ-1. Именно такие дозы используются при проведении туберкулинодиагностики у людей в мире: как правило, в странах с высокой распространенностью туберкулеза, в том числе в Российской Федерации, применяют

Таблица 5. Результаты сопоставления относительной активности 2 и 5 ТЕ ОСО ППД-Л-2 с 2 и 5 IU PPD-T
Table 5. The results of comparing the relative potency of PPD-L-2 IRS (2 and 5 TU) with PPD-T (2 and 5 IU)

Препарат	Доза	Средние реакции на дозу, мм	Индекс специфической активности (I)	t'
ОСО / PPD-T	2 ТЕ	10,95 ± 0,54	1,02	0,28
	2 IU	10,74 ± 0,54		
ОСО / PPD-T	5 ТЕ	13,48 ± 0,32	1,08	2,24
	5 IU	12,51 ± 0,29		

* t-критерий Стьюдента.

пробу Манту с 2 TU (tuberculin unit, туберкулиновая единица), а низкой распространенностью — с 5 TU.

Как следует из данных, приведенных в таблице 5, средние размеры реакций на 2 ТЕ ОСО ППД-Л-2 были такими же, как на 2 IU PPD-T (10,95 ± 0,54 и 10,74 ± 0,54 соответственно), $p \geq 0,95$. Индекс специфической активности был равен 1,02, т. е. не выходил за допустимые пределы (0,95–1,05 при $p < 0,05$). При сопоставлении разведений этих двух препаратов, содержащих 5 туберкулиновых единиц, средние реакции на 5 ТЕ ППД-Л-2 (13,48 ± 0,32) превышали реакции на 5 IU PPD-T (12,51 ± 0,29) при доказанной достоверности различий между средними величинами. При этом индекс специфической активности ППД-Л-2 был выше допустимого предела и был равен 1,08.

Обсуждение

В настоящее время не вызывает сомнения, что антигенные спектры вакцин БЦЖ, изготовленных из разных субштаммов, существенно различаются [3]. Российский и японский субштаммы БЦЖ относятся к группе ранних субштаммов, потерявших в основном RD1-регион генома. Генетические различия между ними незначительные. В то же время эти два субштамма БЦЖ имеют выраженные генетические и антигенные различия с датским субштаммом, который лишен не только RD1, но также основной части RD2-региона генома. Сравнимые туберкулины ППД-Л-2 и PPD-T также не идентичны по антигенному составу. Международный стандарт приготовлен из 1 штамма *M. tuberculosis*, туберкулопротеин был осажден сульфатом аммония с дополнительной очисткой ТХУ и диализом [4]. ППД-Л-2 приготовлен из 2 видов микобактерий — *M. tuberculosis* и *M. bovis*, а туберкулопротеин осажден ТХУ. Известно, что специфическая активность туберкулинов зависит от многочисленных факторов, включая штаммы микобактерий, питательные среды и сроки выращивания культур, методику осаждения и очистки туберкулопротеина, состав растворителя для получения растворов туберкулина при титровании специфической активности субстанции и для изготовления конечного продукта.

От метода получения туберкулина зависит также количественный состав примесей — полисахаридных комплексов, нуклеиновых кислот, липидов. Так, туберкулин PPD-S состоит из 92,9 % белка туберкулопротеина, 5,9 % полисахарида и 1,2 % нуклеиновых кислот [4], в ППД-Л-2 содержится значительно меньше белка (70 %) и значительное количество других фракций.

Характер примесей и их количество могут в значительной мере зависеть также от среды выращивания микобактерий-продуцентов. В итоге вышеописанных вариаций очищенные туберкулины разных производителей обладают неодинаковой активностью и специфичностью [5], что создает значительные трудности в стандартизации специфической активности очищенных туберкулинов относительно международного и национальных стандартов. Свое влияние оказывает также модель,

на которой проводится сопоставление различающихся в антигенном отношении туберкулинов. Результатом этих различий являются, например, неодинаковые размеры ответных реакций на неидентичные туберкулины у морских свинок, сенсibilизированных разными субштаммами БЦЖ. Это приводит к тому, что показатель активности испытуемого туберкулина относительно международного стандарта может в несколько раз различаться в зависимости от модели, на которой проводится сопоставление. Так, согласно полученным нами данным показатель специфической активности отечественного стандарта очищенного туберкулина ППД (ОСО ППД-Л-2 42-28-49) относительно международного стандарта PPD-T значительно отличается при проведении исследований на различных моделях сенсibilизации животных.

На основании проведенных исследований показано следующее.

1. При сопоставлении разведений препаратов туберкулина 5, 25 и 125 туберкулиновых единиц:

1.1. Чем больше различие между субштаммами, используемыми для вакцинации морских свинок, тем значительнее разница в показателе относительной активности испытуемого туберкулина.

На морских свинках, вакцинированных:

- BCG-1, специфическая активность ОСО ППД-Л-2 была в 3 раза выше специфической активности международного стандарта PPD-T;

- BCG Токуо, специфическая активность ОСО ППД-Л-2 была почти в 2,6 раза выше специфической активности международного стандарта PPD-T;

- BCG-1, специфическая активность ОСО ППД-Л-2 была 3,5 раза выше, чем при использовании модели «вакцинация животных BCG Danish»;

- BCG Токуо, специфическая активность ОСО ППД-Л-2 была почти в 3 раза выше, чем при использовании модели «вакцинация животных BCG Danish»;

- BCG Danish, специфическая активность ОСО ППД-Л-2 соответствовала специфической активности международного стандарта PPD-T.

1.2. На животных, зараженных вирулентным штаммом микобактерий туберкулеза или сенсibilизированных убитыми микобактериями туберкулеза, значимые различия в активности туберкулинов отсутствовали.

2. Отмечена зависимость результата испытания от использованных доз сравниваемых препаратов. При сопоставлении разведений 2, 10 и 50 туберкулиновых единиц препаратов:

- специфическая активность ОСО ППД-Л-2 на любой модели вакцинации морских свинок превышала активность PPD-T только на 40–60 %. Такие же результаты получены на модели животных, сенсibilизированных инактивированной культурой *M. tuberculosis* H37 Rv;

- индекс специфической активности 2 ТЕ ОСО ППД-Л-2 относительно 2 IU PPD-T (1st WHO Reference Reagent) на животных, вакцинированных отечественной вакциной БЦЖ, равен

1,02: реакции на препараты были идентичными, индекс специфической активности 5 TE / 5 IU был равен 1,08, а реакции на ОСО ППД-Л-2 статистически значимо выше, чем на международный стандарт.

Приведенные данные свидетельствуют о необходимости использования нескольких моделей сенсibilизации животных при проведении аттестации референс-материала или ОСО относительно международного стандарта, что позволит правильно оценить специфическую активность препарата. Полученные нами результаты указывают на целесообразность корректного выбора модели испытания при необходимости титровать препараты, приготовленные из разных штаммов-продуцентов или с использованием различных технологий получения туберкулинов. Исследования специфической активности ОСО ППД-Л-2 относительно международного стандарта подтвердили высокую стабильность ОСО очищенного туберкулина. При этом необходимо отметить, что, как в свое время иссякли запасы лиофилизата Международного стандарта PPDS, так к настоящему времени значительно уменьшилось количество субстанции ОСО ППД-Л-2. Следует отметить, что ОСО ППД-Л-2 используется на производствах очищенного туберкулина ППД-Л для определения специфической активности порошков-полуфабрикатов (субстанции) очередных осадений туберкулопротеина (набор разведений 5, 25 и 125 TE в 0,1 мл (ОСО ППД-Л-2 42-28-49Б)) и для контроля очередных серий лекарственного препарата туберкулина в стандартном разведении (2 TE) (ОСО ППД-Л-2 42-28-49А). Ежегодное приготовление и контроль разведений ОСО ППД-Л-2 в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, предназначенных для указанных целей, является затратным с точки зрения повышенного расхода субстанции ОСО и проведения дорогостоящего контроля этих разведений по всем тестам, включая определение специфической активности на морских свинках, которые должны длительно (не менее 30 сут) содержаться в виварии до достижения необходимого уровня сенсibilизации. Кроме того, алгоритм ежегодного приготовления и аттестации разведений субстанции ОСО ППД-Л-2 (приготовление мелких навесок субстанции, растворение порошка, приготовление разведений, сенсibilизация животных и проведение контроля специфической активности разведений) является трудоемким и длительным. Алгоритм получения лиофилизированной формы ОСО, рассчитанной на несколько десятилетий, представляет собой однократное разведение субстанции до определенного содержания туберкулина, розлив и лиофильное высушивание единого стандартного пула, последующую аттестацию образцов лиофилизата относительно международного стандарта, что исключает определенное количество возможных ошибок, которые не-

избежны при выполнении ежегодной процедуры. В связи с изложенным представляется целесообразным (аналогично международному стандарту PPDT) изготовление и использование готовых лиофилизированных образцов ОСО ППД-Л-2, содержащих определенное количество туберкулина (например, 10000 или 50000 TE) в емкости. Создание современной формы выпуска отечественного препарата ОСО специфической активности очищенного туберкулина в форме лиофилизата является первостепенной задачей.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 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. 056-00154-19-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (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. Guld J, Bentzon MW, Bleiker MA, Griep WA, Magnusson M, Waaler H. Standardization of a new batch of purified tuberculin (PPD) intended for International use. *Bull World Health Organ.* 1958;19(5):845–951.
2. Леви ДТ, Яблокова ТБ, Радионова РН, Лянда-Геллер БА. Отработка нового национального стандарта очищенного туберкулина млекопитающих. В кн.: *Стандарты, штаммы и методы контроля бактериальных и вирусных препаратов.* М.; 1979. С. 83–6. [Levy DT, Yablokova TB, Radionova RN, Landa-Geller BA. Development of a new national standard for purified tuberculin mammals. In: *Standarty, shtammy i metody kontrolya bakteriynykh i virusnykh preparatov.* Moscow; 1979. P. 83–6 (In Russ.)]
3. Yamamoto S, Yamamoto T. Historical review of BCG vaccine in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2007;60(6):331–6.
4. Seibert FB, Glen JT. Tuberculin purified protein derivative: preparation and analysis of a large quantity for standard. *Amer Rev Tuberc.* 1941;44:9–25.
5. Слогодская ЛВ. Кожные иммунологические пробы при туберкулезе — история и современность. *Туберкулез и болезни легких.* 2013;(5):1–9. [Slogotskaya LV. Immunological skin tests for tuberculosis — history and modernity. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Disease.* 2013;(5):1–9 (In Russ.)]

Об авторах

Александрова Наталья Владимировна, канд. мед. наук, главный эксперт лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России,
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1069-8065>

Леви Диана Тимофеевна, д-р мед. наук, профессор, главный эксперт Управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России,
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0783-9282>

Наконечная Алла Витальевна, эксперт 2 категории лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Савина Анна Александровна, эксперт 2 категории лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Поступила 30.01.2019
После доработки 12.02.2019
Принята к публикации 14.02.2019

Authors

Natalia V. Aleksandrova, Candidate of Medical Sciences, Chief Expert of the Laboratory of Bacterial Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1069-8065>

Diana T. Levi, Doctor of Medical Sciences, Professor, Chief 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 Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0783-9282>

Alla V. Nakonechnaya, 2nd Professional Category Expert of the Laboratory of Bacterial Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products

Anna A. Savina, 2nd Professional Category Expert of the Laboratory of Bacterial Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products

Received 30 January 2019
Revised 12 February 2019
Accepted 14 February 2019



Сергей Харитонович Дегтярев (к 65-летию со дня рождения)

Sergey Kharitonovich Degtyarev (on the 65th Anniversary)

28 января 2019 года исполнилось 65 лет со дня рождения доктора биологических наук, профессора, генерального директора НПО «СибЭнзим» Сергея Харитоновича Дегтярева.

С. Х. Дегтярев родился в 1954 году в г. Комсомольске-на-Амуре Хабаровского края. В 1971 году после обучения в специализированной физико-математической школе (Академгородок г. Новосибирска) поступил в Новосибирский государственный университет, который окончил в 1976 году по специальности «Химия». Сергей Харитонович начал трудовую деятельность в 1976 году во Всесоюзном научно-исследовательском институте молекулярной биологии (в настоящее время — Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, пос. Кольцово Новосибирской области).

В 1980 году после прохождения целевой стажировки в лаборатории энзимологии белкового синтеза в Институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта (Москва) он успешно защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности «Молекулярная биология» на тему «Взаимодействие активных центров триптофанил-тРНК-синтетазы: кинетический анализ «одноцентровых» форм фермента, полученных аффинной модификацией и ограниченным протеолизом».

В 1990 году С. Х. Дегтярев, работая в НПО «Вектор» (сейчас — ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), успешно защитил диссертацию на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности

«Биотехнология» на тему «Эндонуклеазы рестрикции: выявление и культивирование штаммов-продуцентов, выделение и характеристика ферментных препаратов».

В 1991 году после полугодовой работы в компании New England Biolabs (Ипсуич, Массачусетс, США) С. Х. Дегтярев вернулся в Академгородок г. Новосибирска, где создал и возглавил компанию «СибЭнзим», которая занимается разработкой, исследованием и производством новых ферментов для геномных и генно-инженерных работ.

В 2004 году Сергею Харитоновичу присвоено ученое звание профессор по специальности «Молекулярная биология».

В настоящее время научно-производственное объединение «СибЭнзим» под руководством С. Х. Дегтярева занимается производством и реализацией ферментов метаболизма нуклеиновых кислот и сопутствующих препаратов, используемых в молекулярно-биологических исследованиях и генно-инженерных работах.

Основными направлениями научной деятельности С. Х. Дегтярева являются выделение и изучение новых сайт-специфичных ферментов, преимущественно бактериальных ДНК эндонуклеаз и ДНК-метилтрансфераз; исследование геномов эукариот; разработка новых методов работы с протяженными ДНК; эпигенетические исследования.

Сергей Харитонович Дегтярев лично и в соавторстве опубликовал более 300 научных трудов, является соавтором более 25 патентов на изобретения. Под его руководством защищено семь кандидатских и одна докторская диссертация.



15-16

АПРЕЛЯ 2019

РегЛек–ЕАЭС

Научно -практическая конференция
«ЭКСПЕРТИЗА И РЕГИСТРАЦИЯ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В ЕАЭС»
«РЕГЛЕК – ЕАЭС 2019»

В конференции примут участие ведущие эксперты и представители регуляторных органов стран ЕАЭС (Российская Федерация, Республика Беларусь, Республика Казахстан и др.), сотрудники зарубежных и российских фармацевтических компаний производителей и поставщиков лекарственных средств

Основные темы конференции

- *Практические основы приведения регистрационного досье в соответствие с правилами ЕАЭС*
- *Взаимодействие национального и единого регулирования на рынке обращения лекарственных средств в переходный период 2019–2021 гг.*
- *Требования к формированию электронное досье по Правилам ЕЭК*
- *Современные требования к оценке качества лекарственных средств*
- *Частные вопросы оценки отношения ожидаемой пользы к возможным рискам применения препаратов в рамках современного законодательства*
- *Экспертиза иммунобиологических и биотехнологических лекарственных препаратов*
- *Аудиты GXP практик в фармацевтических компаниях*
- *GxP-инспектирование на рынке ЕАЭС: инспекции в рамках экспертной оценки регистрационных досье*
- *Требования к составлению, внесению изменений и экспертизе инструкций по медицинскому применению лекарственных препаратов: последние изменения нормативно-правовой базы*
- *Требования к сервис-провайдерам в системе менеджмента качества фармкомпаний*
- *Практические аспекты лабораторной экспертизы качества лекарственных средств*
- *Другие актуальные вопросы в сфере экспертизы и регистрации лекарственных средств ЕАЭС*

Более подробно о конференции на www.regmed.ru

9-14
июня 2019

Екатеринбург, Россия



4-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием MedChem Russia 2019

Организаторы

- Российская академия наук
- Уральское отделение Российской академии наук
- Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
- Министерство здравоохранения РФ
- Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина
- Правительство Свердловской области
- Министерство промышленности и науки Свердловской области
- Администрация города Екатеринбурга
- Отделение химии и наук о материалах РАН
- Научный совет по медицинской химии РАН
- Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова
- Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН
- Институт иммунологии и физиологии УрО РАН
- Институт физики металлов им. М.Н. Михеева УрО РАН
- Институт физиологически активных веществ РАН
- Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения РФ
- Уральский государственный медицинский университет
- Российский фонд фундаментальных исследований
- Общероссийская общественная организация «Российское химическое общество им. Д.И. Менделеева»

Научная программа охватывает следующие темы:

- Инновационные разработки в актуальных терапевтических областях;
- Новые синтетические и технологические подходы в медицинской химии;
- Компьютерное прогнозирование, виртуальный скрининг, био- и хемоинформатика;
- Нанокompозиты, системы доставки лекарств;
- Разработка инновационных противоопухолевых препаратов;
- Новые материалы для медицины;
- Клеточные технологии, разработка биофармацевтических препаратов.

Научная программа конференции МедХим-Россия 2019 будет включать пленарные лекции, устные доклады и стендовые презентации. В рамках конференции будут проведены Молодежная школа-конференция по медицинской химии, секции по компьютерной химии, клеточным технологиям, отечественным противоопухолевым и противоиnфекционным препаратам, а также материалам для медицины. В дополнение к научной программе предусмотрены мероприятия, направленные на обеспечение бизнес-коммуникаций.

Сайт конференции: <http://medchem2019.uran.ru>



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



ISSN 2221-996X



9 772221 996004